

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور – پژوهشکده اکولوژی دریای خزر

عنوان :

مطالعه برخی از عوامل خطر و ارزیابی
تأثیر آنها در بروز استرپتوکوکوزیس در
مزارع پرورش ماهیان سردآبی در شرق استان مازندران

مجری :

علی اصغر سعیدی

شماره ثبت

۴۷۵۷۹

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور - پژوهشکده اکولوژی دریای خزر

عنوان پروژه : مطالعه برخی از عوامل خطر و ارزیابی تاثیر آنها در بروز استرپتوکوکوزیس در مزارع پرورش ماهیان سردآبی در شرق استان مازندران

شماره مصوب پروژه : ۹۰۰۰۴-۹۰۰۱-۱۲-۷۶-۱۴

نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : علی اصغر سعیدی

نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) : ابوالفضل سپهداری

نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : علی اصغر سعیدی

نام و نام خانوادگی همکار(ان) : عیسی شریف پور، شاپور کاکولکی، محمدرضامهرابی، محبوبه فلاح ، رضا پورغلام، مصطفی شریف روحانی، مریم قیاسی، آذین زاهدی طبرستانی، شهریار بهروزی، فرشیده حبیبی کوتناهی، لاله ذبیحی، افسانه عمومی، رامین پور زاهدی

نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : کاظم عبدی

نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : سید جلیل ذریه زهرا

محل اجرا : استان مازندران

تاریخ شروع : ۹۰/۳/۱

مدت اجرا : ۲ سال

ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

تاریخ انتشار : سال ۱۳۹۵

حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است .

«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»

پروژه : مطالعه برخی از عوامل خطر و ارزیابی تاثیر آنها در بروز
استرپتوکوکوزیس در مزارع پرورش ماهیان سردآبی در شرق استان
مازندران

کد مصوب : ۹۰۰۰۴-۹۰۰۱-۱۲-۷۶-۱۴

شماره ثبت (فروست) : ۴۷۵۷۹ تاریخ : ۹۴/۶/۱

با مسئولیت اجرایی جناب آقای علی اصغر سعیدی دارای مدرک تحصیلی
دکتری در رشته دامپزشکی می باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش بهداشت و بیماریهای آبزیان در

تاریخ ۹۴/۵/۷ مورد ارزیابی و رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد □ پژوهشکده ■ مرکز □ ایستگاه

با سمت عضو هیئت علمی در پژوهشکده اکولوژی دریای خزر مشغول بوده
است.

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه
چکیده	۱
۱- کلیات	۳
۱-۱- ماهی قزل آلا ی رنگین کمان	۳
۱-۲- میزان تولید ماهی قزل آلا در جهان ، ایران و فارس	۴
۲- مقدمه	۶
۲-۱- عوامل باکتریایی استرپتوکوکوزیس در ماهیان	۷
۲-۲- میزان های حساس	۷
۲-۳- ویژگی های عامل بیمارزا	۹
۲-۴- علائم کلینیکی و آسیب شناسی ناشی از استرپتوکوکوزیس	۱۱
۲-۵- تلفات و خسارتهای اقتصادی ناشی از استرپتوکوکوزیس	۱۱
۲-۶- تاریخچه استرپتوکوکوزیس در ایران	۱۲
۳- مواد و روش کار	۱۴
۳-۱- ایستگاههای منتخب (مزارع پرورش ماهی قزل آلا ی رنگین کمان)	۱۵
۳-۲- نمونه برداری	۱۵
۳-۳- انجام آزمایشات مولکولی	۱۸
۳-۴- آزمایشات فیزیوشیمیایی آب	۲۲
۴- نتایج	۲۴
۴-۱- علائم مشاهده شده در ماهیان مورد بررسی	۲۴
۴-۲- برخی پارامترهای فیزیوشیمیایی آب (عوامل خطر) در بروز استرپتوکوکوزیس	۲۷
۴-۳- تعداد کلی باکتری های داخل آب	۳۵
۵- بحث	۳۷
پیشنها دها	۴۴
منابع	۴۵
پیوست	۵۲
چکیده انگلیسی	۵۷

چکیده

استرپتوکوکوزیس یک بیماری عفونی باکتریایی است که در اکثر مراکز تکثیر و پرورش ماهیان سردابی (قزل آلا ی رنگین کمان) کشور ما مشاهده شده است. این بیماری دارای این قابلیت است که به شکل همه گیر مزارع ماهیان سردابی ما را در اقلیم های مختلف تهدید نماید و خسارتهای اقتصادی زیادی را به صنعت آبی پروری وارد نماید. در بروز، گسترش و اپیدمی شدن این بیماری عوامل تاثیر گذاری از جمله: درجه حرارت، فصول، سن، وزن، نقل انتقال تخم و بچه ماهی، منابع آب مشترک، «منابع آب (چشمه، چاه و رودخانه) و نقش دارند. به منظور شناسایی و تعیین عوامل موثر در اپیدمی شدن بیماری در مراکز تکثیر و پرورش ماهیان سردابی پس از هماهنگی با اداره کل شیلات استانهای مازندران، فارس و و تعاونی ماهیان سردابی و با هماهنگی اداره کل دامپزشکی استانهای مذکور و با توجه به طرحهای آماری استاندارد مزارع تکثیر و پرورش این استانها زیر پوشش پروژه قرار گرفت و در یک برنامه زمانی منظم اقدام به ثبت اطلاعات مربوط به عوامل اپیدمیولوژیک در قالب پرسشنامه و نمونه برداری و ارسال نمونه ها به آزمایشگاه های تخصصی جهت تشخیص شد. کلیه آزمایشات مربوط به جداسازی باکتری استرپتوکوک براساس دستورالعملهای مربوطه و کلیه روش های آزمایشگاهی توصیه شده در مورد باکتری استرپتوکوک در جهت تشخیص استفاده شد.

عملیات اجرایی پروژه در مزارع منتخب در شرق استان مازندران (محدوده رودخانه هراز) توسط پژوهشکده اکولوژی دریای خزر و باهمکاری اداره کل دامپزشکی استان مازندران از تیر ماه سال ۱۳۹۰ تا مرداد ماه سال ۱۳۹۱ با تلاش و همکاری صمیمانه به اتمام رسید.

عملیات مشابه از خرداد ماه سال ۱۳۹۰ الی تیر ماه سال ۱۳۹۱ با مجری گری مرکز تحقیقات ماهیان سردابی (تنکابن) و باهمکاری اداره کل دامپزشکی استان مازندران به مرحله اجرا درآمد.

عملیات اجرایی پروژه در استان فارس بواسطه عدم تامین اعتبار در سال ۱۳۹۰ متوقف گردید که با پیگیری ها و هماهنگی های بعمل آمده اعتبار مورد نظر در مهر ماه سال ۱۳۹۱ تامین و نمونه برداری ها از مزارع منتخب از تاریخ مذکور شروع و در مهر ماه سال ۱۳۹۲ به اتمام رسید.

در نگاهی اجمالی به نتایج بدست آمده از اجرای طرح موضوعات ذیل می تواند مورد توجه قرار گیرد:

- ابتلا به بیماری در تمامی دوره های سنی ماهی قزل آلا ی رنگین کمان مشاهده شده و میزان ابتلا در ماهیان جوان از شدت بالاتری برخوردار است.

- مشاهده بیماری حتی در مزارع سر چشمه که ورودی آب از مزارع بالا دست ندارند موید امکان انتقال بیماری از طریق ماهیان انتقالی به مزارع و یا منابع دامی و انسانی آلوده باشد.

- گزارش جداسازی استرپتوکوکوک یوبریس برای اولین بار از ماهیان آلوده در استان مازندران (منطقه هراز)، لزوم تاکید بیشتر بر جابه جایی مسئولانه آبزیان زنده و ایجاد پست های فعال قرنطینه جهت کنترل جابه جایی ها در محدوده مرزهای داخلی را گوشزد می نماید.

- مشاهده علائم بیماری ، بدون امکان جداسازی عوامل باکتریایی بیماری زا ، مؤثر مصرف بی رویه آنتی بیوتیک ها در مزارع پرورشی است. طبعاً ارائه آموزش ها و تدوین دستورالعمل های اجرایی لازم در این رابطه جهت جلوگیری از ایجاد سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک و ایجاد باقیمانده های دارویی در محصول نهایی باید مد نظر باشد.

- بروز بیماری در مناطق تحت مطالعه از برخی از عوامل محیطی از جمله : درجه حرارت ، میزان نیتريت، نیترات و...، تاثیر پذیر بوده و مدیریت عوامل مذکور می تواند در کاهش احتمال بروز بیماری موثر باشد.

- میزان شیوع بیماری و خسارات ناشی از آن در مناطق مورد مطالعه نسبت به سنوات گذشته از کاهش قابل ملاحظه ای برخوردار بوده است. انجام واکسیناسیون در سنوات گذشته ، ارائه خدمات نظارتی و اطلاع رسانی در کنار بومی شدن بیماری از جمله عواملی است که میتواند در روند مذکور موثر بوده باشد.

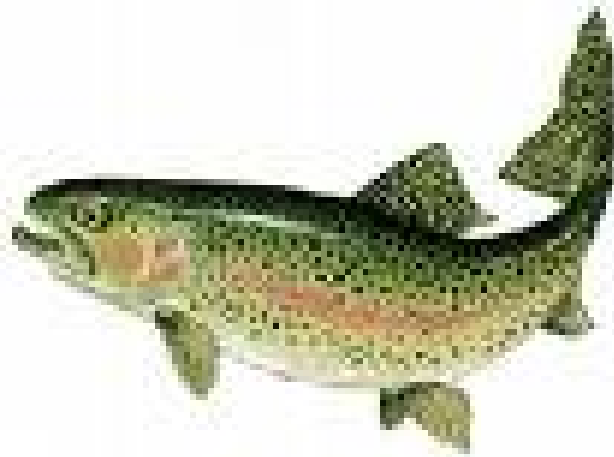
- گزارش بیماری یرسینیوز در برخی از مزارع تحت مطالعه در کنار استرپتوکوکوزیس موید این مطلب است که تقریباً با یک بار مشاهده یرسینیوزیس ، ۲/۱۷ برابر در احتمال وقوع بیماری استرپتوکوکوزیس تغییر ایجاد می شود (استان فارس). این موضوع اهمیت بالایی داشته و باید با دقت بیشتری مورد مطالعه قرار گیرد.

- برقراری پست های قرنطینه درون مرزی ، پایش مستمر بیماری در مناطق و استانهای مهم پرورش دهنده قزل آلای رنگین کمان ، تدوین مقررات و دستورالعمل های اجرایی بهداشتی ، ارائه آموزش ها و اطلاع رسانی هدفمند ، واکسیناسیون و استفاده بهینه از تقویت کننده های سیستم ایمنی از جمله اقداماتی هستند که در کنار مدیریت بهداشتی مناسب و کنترل عوامل خطر ساز محیطی ، خسارات ناشی از این بیماری را به حد اقل خواهند رساند.

نتایج و دستاوردهای حاصل از ارزیابی های انجام شده به تفکیک مناطق عملیاتی در گزارش حاضر آمده است.

۱ - کلیات

جایگاه قزل آلاي رنگين کمان در صنعت آبيزي پروري جهان و ايران



شکل ۱: ماهی قزل آلاي رنگين کمان

۱-۱- ماهی قزل آلاي رنگين کمان

قزل آلاي رنگين کمان با نام علمي *Oncorhynchus mykiss*، از خانواده Salmonidae و جنس *Oncorhynchus* است. اين ماهي داراي يک نوار پهن به صورت رنگين کمان در هر طرف بدن مي باشد. بر روي سر، بدن، پشت، باله چربي و باله دمي اين ماهي لکه هاي تيره رنگ ديده مي شوند. اين ماهي بومي سواحل غربي شمال آمريکا است و از سال ۱۸۸۰ به ساير نقاط دنيا انتقال يافت. امروزه ماهي قزل آلاي رنگين کمان به صورت ماهي شماره يک اکثر کارگاه هاي تکثير و پرورش ماهيان سردآبي در بيشتر نقاط جهان درآمده است. از خصوصياتي که اين ماهي را مورد توجه قرار داده، سازش خوب آن با شرايط پرورش متراکم است از طرف ديگر اين ماهي در انتخاب غذا زياد سخت گير نيست و به راحتی از غذاي دستي مصنوعي استفاده مي کند و از سرعت رشد خوبي نيز برخوردار مي باشد (وئوقي و مستجير، ۱۳۷۹). در برابر تغييرات محيطي نظير تغيير در مقدار O_2 و CO_2 محلول در آب، آلودگي هاي کم و درجه حرارت، مقاوم و از سرعت رشد مناسبي برخوردار است، در دهان اين ماهي بر روي فک ها، سقف و زبان، دندان هاي تيز و به عقب برگشته اي وجود دارد که تنها براي گرفتن و هدايت طعمه به دستگاه گوارش کاربرد دارند (۹۲، ۵۳، ۲۴، ۵).

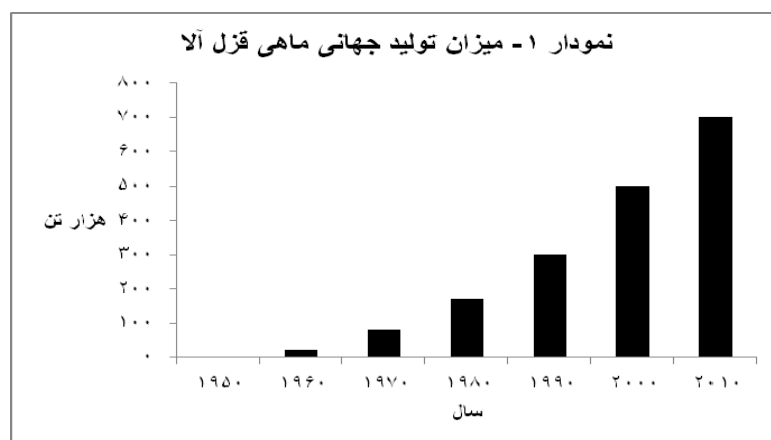
خصوصيات فزيکي و شيميايي آب زيستگاه ماهي قزل آلاي رنگين کمان :

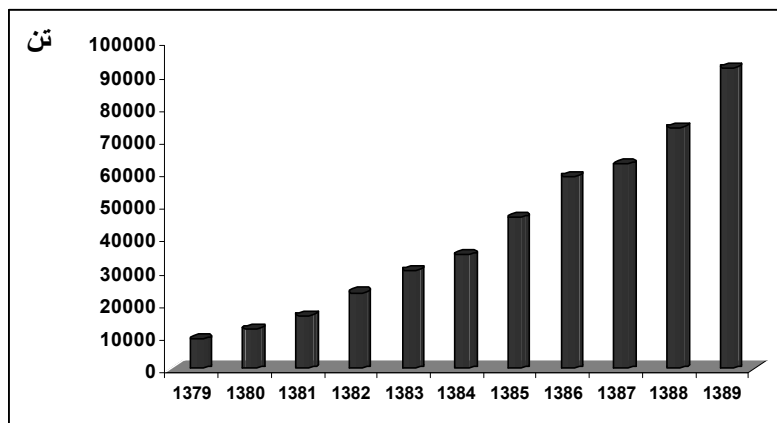
از نظر خصوصيات فزيکي و شيميايي آب، براي ماهي قزل آلاي رنگين کمان، مناسب ترين درجه حرارت براي پرورش، دامنه حرارتي ۱۴ - ۱۷ و تخم ريزي دامنه حرارتي ۱۴ - ۹ درجه سانتي گراد، حداکثر دماي قابل

تحمل برای ماهی قزل آلا حدود ۲۵ درجه سانتی گراد (Klantz,1993,Hvet,1994)، فرزانهفر، ۱۳۸۴ و عمادی (۱۳۸۶)، حد مطلوب اکسیژن محلول آب در محدوده ۹-۱۱ میلی گرم در لیتر (لاوسون، ۱۳۸۰)، pH مناسب در دامنه ۶/۵-۸ (Robert,2005)، میزان آمونیاک در استخرهای پرورش کمتر از ۰/۱ میلی گرم در لیتر (Robert,2005)، نیتريت کمتر از ۰/۱ میلی گرم در لیتر (لاوسون، ۱۳۸۰)، نترات ۲-۳ میلی گرم در لیتر (Robert,2005)، CO₂ محلول در آب بین ۰-۱۰ میلی گرم در لیتر (Boyd,1982,Slickney, 2005)، عمادی، (۱۳۸۶)، قلیائیت تام در حدود ۱۰-۴۰۰ میلی گرم در لیتر، دامنه سختی مناسب ۱۲۰-۴۰۰ میلی گرم در لیتر بر حسب کربنات کلسیم (Slickney, 2005، Robert,2005، فرزانهفر، ۱۳۸۴)، درجه شوری حدود ۳-۶ قسمت در هزار (Slickney, 2005، Pillay,2005، فرزانهفر، ۱۳۸۴)، سرعت جریان آب در کانال ها ۲-۳ سانتیمتر در ثانیه (Slickney, 2005، فرزانهفر، ۱۳۸۴، عمادی، ۱۳۸۶) می باشد.

۲-۱- میزان تولید ماهی قزل آلا در جهان، ایران و فارس

تولید قزل آلا رنگین کمان بطور تصاعدی از دهه ۱۹۵۰ خصوصاً در اروپا و اخیراً در شیلی افزایش داشته است. این مسئله می تواند مربوط به تولید فزاینده این ماهی در آبهای داخلی در کشورهایی مانند فرانسه، ایتالیا، دانمارک، آلمان و اسپانیا، ایالت متحده آمریکا، آلمان، بریتانیا و ایران جهت استفاده در بازارهای محلی و یا پرورش آنها در قفس در نروژ و شیلی برای صادرات باشد. میزان تولید این ماهی در سال ۲۰۱۰ بیش از ۷۰۰ هزار تن بوده است (http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oncorhynchus_mykiss/en) (نمودار ۱). در صنعت آبرزی پروری ایران نیز این ماهی اهمیت به سزایی داشته و طی چند سال گذشته میزان تولید آن از رشد چشمگیری برخوردار بوده است، بطوریکه آمار بدست آمده از سال ۱۳۷۷ تا ۱۳۸۹ نشان داده است که تولید قزل آلا رنگین کمان در کشور از ۴۹۹۴ تن در سال ۱۳۷۷ به ۹۲۰۰۰ تن در سال ۱۳۸۹ رسیده است و این به معنی یک افزایش ۱۸/۵ برابری تولید طی ۱۲ سال گذشته است (آمار شیلات ایران ۱۳۸۹، ذریه زهرا، ۱۳۸۴)





نمودار ۲ - مقایسه میزان تولید قزل آلاي رنگين کمان طی سالهای ۱۳۷۷ - ۱۳۸۹ در کشور

۲- مقدمه

یکی از مهمترین بیماریهای عفونی باکتریایی که بیش از دو دهه موجب بروز خسارات اقتصادی فراوان در صنعت آبرزی پروری شده است، عفونتهای استرپتوکوکوسی است که یکی از بیماریهای اصلی سپتیمی دهنده عمده مراکز تکثیر و پرورش ماهیان سردآبی در بسیاری از کشورهای دنیا و از جمله در ایران معرفی شده است و تخمین زده شده که این بیماری موجب خسارات اقتصادی شدید و جبران ناپذیر (بیش از ۱۵۰ میلیون دلار در سال) در دنیا می گردد (Beack و همکاران ۲۰۰۶، Romald و همکاران ۲۰۰۸، Garcia, et, Shoemaker, et al., 2006, al., 2008 و Romalde, et al., 2008). این بیماری اولین بار از کشور ژاپن گزارش گردید (Hoshina و همکاران ۱۹۵۸) لیکن بتدریج گزارشات متعددی از بروز آن در کشورهای مختلف مانند: سنگاپور (Foo و همکاران ۱۹۸۵)، آفریقای جنوبی (Bragg و Broere ۱۹۸۶)، استرالیا (Carson و همکاران ۱۹۹۳)، اسپانیا (Toranz و همکاران ۱۹۹۴)، آمریکا (Perera و همکاران ۱۹۹۴)، اسرائیل (Eldar و همکاران ۱۹۹۵)، ایتالیا (Ghittion و همکاران ۱۹۹۵)، فرانسه (Michel و همکاران ۱۹۹۷)، کویت (Evans و همکاران ۲۰۰۲)، کره جنوبی (Beack و همکاران ۲۰۰۶)، برزیل (Filho و همکاران ۲۰۰۹)، ایتالیا (Elder et al 1997)، در بین ماهیان Red Sea bream و کفال در کویت (Evans et al, 2002)، در ماهیان دریایی واقع در خلیج مکزیکو (Plumb et al, 1974)، خلیج چیسایک در آمریکا (Baya et al, 1990)، در آزاد ماهی کوهو، مارماهی ژاپنی، ماهی آبو و تیلایا (Austin and Austin, 1993)، در گربه ماهی (Chang et al 1996)، در ماهی کپور معمولی (Bunch et al, 1997) و در ایران نیز این بیماری در بین مولدین ماهی قزل آلا (رنگین کمان در استان مازندران (قیاسی و همکاران، ۱۳۷۹)، استان فارس، در ماهی قزل آلا (آذری تاکامی، ۱۳۷۶)، ماهی هامور در استان خوزستان (مظلومی، ۱۳۸۲) شناسایی و گزارش گردیده، که نشان دهنده بروز این بیماری در تمام قاره های دنیاست.

۱-۲- عوامل باکتریایی استرپتوکوکوزیس در ماهیان

اصولاً استرپتوکوکوزیس ناشی از حضور عوامل باکتریایی کوکسی شکل گرم مثبت است که آنها را به عنوان جنس استرپتوکوکوس می شناسند. لیکن طی دهه گذشته تغییرات زیادی در طبقه بندی عوامل ایجاد کننده این بیماری رخ داده است. با ایجاد روش های تشخیصی جدید بر پایه خصوصیات ژنوتیپی، طبقه بندی جدید ایجاد شده و جنسهای انتروکوکوس، لاکتوکوکوس، واگوکوکوس و کارنوباکتریوم به جنس استرپتوکوکوس افزوده شده است (Venderell و همکاران ۲۰۰۶)، (Romalde و همکاران ۲۰۰۸)، (Austin, Yanong and Floyd, 2002)، (Austin and Austin, 1999)، (Austin, 1993)، (pasnike et al, 2006).

- *Enterococcus faecalis*
- *Entrococcus faecium*
- *Streptococcu agalactiae*
- *Streptococcus dysgalactia*
- *Streptococcus equi*
- *Streptococcus equisimilis*
- *Streptococcus pyogenes*
- *Streptococcus zooepidermicus*
- *Streptococcus iniae*
- *Lactococcus piscium*
- *Lactococcus garvieae* = *Entrococcus seriolicida*
- *Streptococcus milleri*
- *Streptococcus parauberis*
- *Streptococcus difficilis*
- *Vagococcus salmoninarum*
- *Streptococcus phocae*
- *streptococcus ictaluri*

۲-۲- میزبانهای حساس (ماهیان)

استرپتوکوکوزیس در بسیاری از گونه های ماهیان دریایی (Eldar et al, 1999; Colorni et al, 2000; Romalde et al, 2002) و ماهیان آب شیرین (Yanong and Floyed, 2002) هم در ماهیان پرورشی و هم ماهیان وحشی (Baya et al, 1990; Zlotkin et al., 1998; Colorni et al, 2002) گزارش شده است. اسامی این ماهیان در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱: میزبان های حساس (ماهیان) به استرپتوکوکوزیس

نام ماهی	نام علمی ماهی	باکتری	منبع
Wild mullet	<i>Liza klunzingeri</i>	<i>Streptococcus agalactia</i>	Evans et al, 2002
Sea bream	<i>Sparus auratus</i>	<i>Streptococcus agalactia</i>	Evans et al, 2002
Red-Tail Black Shark	<i>Epalzeorhynchus bicolor</i>	<i>Streptococcus iniae</i>	Russo et al, 2006
Rainbow Shark	<i>Epalzeorhynchus erythrurus</i>	<i>Streptococcus iniae</i>	Russo et al, 2006
Rainbow trout	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>Vagococcus salmoninarum</i>	Zarauela et al, 2005
ماهیان تترا	<i>Hyphessobrycon sp</i>	<i>Streptococcus iniae</i>	Yanong and Floyd, 2002
سیچلیدهای آفریقایی	<i>Ninbochromis sp</i> <i>Pelvicachromis sp</i>	<i>Streptococcus iniae</i>	Yanong and Floyd, 2002

Bowser <i>et al</i> , 1998	<i>Streptococcus iniae</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	تیلاپای نیل
Nomoto <i>et al</i> , 2004; Kusuda <i>et al</i> , 1976	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	<i>Seriola quinqueradiata</i>	Yellow tail
Nomoto <i>et al</i> , 2004	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	<i>Seriola dumerili</i>	Amberjack
Shen <i>et al.</i> , 2005	<i>Streptococcus iniae</i>	<i>Sciaenops ocellatus</i>	Red drum
Baya <i>et al</i> , 1990	<i>Streptococcus sp.</i>	<i>Micropogon undulates</i>	کروکر آتلانتیک
Baya <i>et al</i> , 1990	<i>Streptococcus sp.</i>	<i>Pomatomus saltatrix</i>	Blue fish
Baya <i>et al</i> , 1990	<i>Streptococcus sp.</i>	<i>Notemigonus chryssoleuca</i>	Golden shiner
Baya <i>et al</i> , 1990	<i>Streptococcus sp.</i>	<i>Arius felis</i>	گره ماهی دریایی
Baya <i>et al</i> , 1990	<i>Streptococcus sp.</i>	<i>Brevoortia patronus</i>	منهادن
Baya <i>et al</i> , 1990	<i>Streptococcus sp.</i>	<i>Lagodon rhomboids</i>	Pin fish
Baya <i>et al</i> , 1990	<i>Streptococcus sp.</i>	<i>Dasyatis sp</i>	Stingray
Baya <i>et al</i> , 1990	<i>Streptococcus sp.</i>	<i>Morone saxatilis</i>	باس راه راه
Shoemaker <i>et al.</i> , 2001	<i>Streptococcus sp.</i>	<i>Morone chrysops</i> x <i>Morone saxatilis</i>	باس راه راه هیبرید
Baya <i>et al</i> , 1990	<i>Streptococcus sp.</i>	<i>Leiostomus xanthurus</i>	Spot
Baya <i>et al</i> , 1990	<i>Streptococcus sp.</i>	<i>Cynoscion regalis</i>	قزل آلالی دریایی
Baya <i>et al</i> , 1990	<i>Streptococcus sp.</i>	<i>Cynoscion nothus</i>	قزل آلالی نقره ای
Baya <i>et al</i> , 1990	<i>Streptococcus sp.</i>	<i>Mugil cephalus</i>	کفال راه راه
Yuniarti., 2005; George <i>et al</i> , 1999	<i>Streptococcus sp.</i>	<i>Inia geoffrensis</i>	دلفین آب شیرین آمازون
سلطانی، ۱۳۷۵	<i>Streptococcus sp.</i>	<i>Anguilla japonica</i>	مارماهی ژاپنی
Agnew and Barnes, 2007	<i>Streptococcus iniae</i>	<i>Plecoglossus altivelis</i>	ماهی آیو
Agnew and Barnes, 2007	<i>Streptococcus iniae</i>	<i>Oncorhynchus rhodurus</i>	ماهی آزاد آماگو
Agnew and Barnes, 2007	<i>Streptococcus iniae</i>	<i>Lates calcarifer</i>	Barramundi
Agnew and Barnes, 2007	<i>Streptococcus iniae</i>	<i>Anisotrenus sp</i>	Black marget
Agnew and Barnes, 2007	<i>Streptococcus iniae</i>	<i>Arothron hispidus</i>	Puffer fish
Agnew and Barnes, 2007	<i>Streptococcus iniae</i>	<i>Ocyunus chrysurs</i>	Snapper
Agnew and Barnes, 2007	<i>Streptococcus iniae</i>	<i>Sparisoma aurofrenatum</i> <i>S. viridae</i>	Parrot fish
ستاری و روستایی، ۱۳۷۷	<i>Streptococcus sp.</i>	<i>Lepomis cyanellus</i>	خورشید ماهی سبز
Sako, 1998	<i>Streptococcus sp.</i>	<i>Trachurus japonicus</i>	جک ماکرل
Agnew and Barnes, 2007	<i>Streptococcus iniae</i>	<i>Paralichthys olivaceus</i>	ژاپنی کفشک
Russo <i>et al</i> , 2006	<i>Streptococcus sp.</i>	<i>Danio rerio</i>	Zebra danio
Russo <i>et al</i> , 2006	<i>Streptococcus sp.</i>	<i>Danio albolineatus</i>	Pearl danio
Russo <i>et al</i> , 2006	<i>Streptococcus sp.</i>	<i>Botia macracanthus</i>	دلچک ماهی
Russo <i>et al</i> , 2006	<i>Streptococcus sp.</i>	<i>Barbus conchoniis</i>	Rosy barb
Agnew and Barnes, 2007	<i>Streptococcus iniae</i>	<i>Cromileptes altivelis</i>	Brramundi cod
Agnew and Barnes, 2007	<i>Streptococcus iniae</i>	<i>Epinephalis tauvina</i>	Gold spot cod
Agnew and Barnes, 2007	<i>Streptococcus iniae</i>	<i>Siganus sp</i>	Rabbit fish
Agnew and Barnes, 2007 Eldar and Ghittino, 1999 Zarauela <i>et al</i> , 2005	<i>Streptococcus sp.</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	قزل آلالی رنگین کمان

۲-۳-۲ ویژگی های عامل بیماریزا

۲-۳-۱- واگوکوکوس (Vagococcus)

باکتریهای گرم مثبت کروی، تخم مرغی و یا میله ای کوتاه هستند که به صورت منفرد، جفت و یا زنجیره های کوتاه دیده می شوند (MacFaddin, 2000). ابعاد آنها $2/0 - 0/5 \times 1/2 - 0/5$ میکرو متر بوده، بدون تشکیل اسپوراند، از برخی از قندها تولید اسید می نمایند، کاهنده نیترات نیستند و حرارت بهینه برای آنها ۲۵ - ۳۵ درجه سانتی گراد است. تحرک در آنها متغیر و معمولاً مثبت است. برخی گونه ها در لانسفیلد گروه N هستند (MacFaddin, 2000).

۲-۳-۲- انتروکوکوس (Enterococcus)

باکتری های گرم مثبت کروی شکل که در محیط مایع به صورت جفت، زنجیره کوتاه و یا به صورت منفرد با ابعاد $2/5 - 0/6 \times 2/0 - 0/6$ میکرومتر دیده می شوند (Holt et al., 1994). بدون تشکیل اسپور بوده و کاتالاز منفی اند (MacFaddin, 2000). گاه دارای حرکت به وسیله تازکهای کم هستند، بدون کپسولهای واضح و آشکاراند، معمولاً در دمای ۱۰ تا ۴۵ درجه سانتی گراد (دمای بهینه ۳۷ درجه سانتی گراد)، $pH = 9/6$ ، $NaCl = 6/5$ ppt و صفرای ۴۰٪ رشد می کنند (Holt et al., 1994). معمولاً لانسفیلد گروه D هستند (MacFaddin, 2000) مقدار زیادی از قندها را تخمیر کرده و به ندرت تولید نیترات می کنند (Holt et al., 1994).

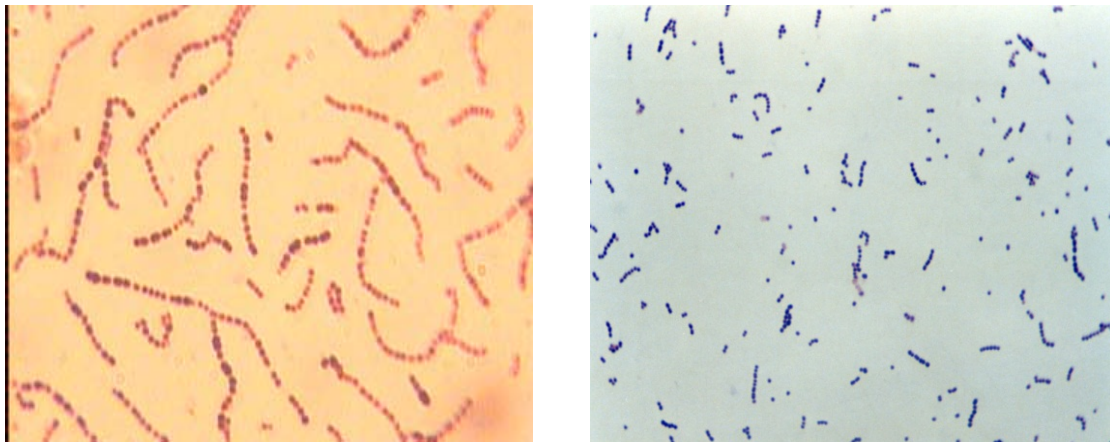
۲-۳-۳- لاکتوکوکوس (Lactococcus)

باکتریهای گرم مثبت کروی تا تخم مرغی شکل به ابعاد $1/5 - 0/5 \times 1/2 - 0/5$ میکرومتر بوده که در محیط مایع به صورت جفت و یا زنجیره کوتاه دیده می شوند. بدون حرکت و بدون کپسولاند، یک تعدادی از قندها را تخمیر می کنند. اکسیداز و کاتالاز منفی هستند. بهترین درجه حرارت ۳۰ درجه سانتی گراد است. در ۱۰ درجه سانتی گراد رشد می کنند اما در ۴۵ درجه سانتی گراد رشد نمی کنند (Holt et al., 1994).

۲-۳-۴- استرپتوکوکوس (Streptococcus)

باکتریهای کروی یا تخم مرغی شکل گرم مثبت که به صورت جفت یا زنجیره ای دیده می شوند (MacFaddin, 2000). قطر آنها $0/5$ تا 2 میکرو متر بوده، بدون تحرک، فاقد اسپور، اکسیداز و کاتالاز منفی، بی هوازی اختیاری، شیمیوارگانوتروف و نیازمند به محیط غذایی غنی جهت رشد و گاه با $5\% CO_2$ هستند. متابولیسم تخمیر کننده دارند و تولید لاکتوز می کنند، اما گاز SH_2 تولید نمی کنند. معمولاً به گلبولهای قرمز حمله می کنند و دارای همولیزهای نوع α و β و بدون همولیز نیز می باشند. در دمای ۲۵ - ۴۵ درجه سانتی گراد رشد

کرده اما حرارت بهینه برای آنها ۳۷ درجه سانتی گراد است (Holt et al., 1994). از لحاظ O/F glucose ، F ، (Fermentative) هستند و از لحاظ تبدیل و کاهش نیترات ، منفی هستند (MacFaddin, 2000).



شکل ۲: باکتری کروی و تخم مرغی شکل استرپتوکوکوس

این ارگانسم ها غیراسیدفست اند و درصد سیتوزین + گوانین در DNA آنها برابر ۴۶-۴۴ مول می باشد (سلطانی، ۱۳۸۰).

برخی گونه های استرپتوکوک دارای آنتی ژنهای پلی ساکارییدی ویژه ای اند که به گروه های مشخص (گروه-های لانسفیلد ۱) اختصاص پیدا می کنند و بر اساس حضور این گروه های آنتی ژنی مخصوص به گروه های A, (O)B, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N طبقه بندی می شوند. که گروه های B و D لانسفیلد در ماهی های بیمار گزارش شده است. گروه استرپتوکوکسی D، کلنی هایی شبیه استافیلوکوکسی تولید می کنند (Austin and Austin, 1993).

یکی از مهمترین خصوصیات باکتری استرپتوکوک تجزیه گلبولهای قرمز خون (Hemolytic) است، که بر اساس آن به سویه های مختلف α - hemolytic ، β - hemolytic و یا غیر همولیز تقسیم می گردند، که یکی از عوامل یکسان نبودن بیماریزایی آنهاست. اگر چه برخی مانند *Streptococcus agalactiae* می توانند هم سویه α - hemolytic و هم β - hemolytic را داشته باشند (Austin and Austin, 1993).

گونه های زیادی از استرپتوکوکوس می تواند در ماهی بیمارزا باشند، اما اطلاعات کافی برای تعیین اینکه کدام گونه از استرپتوکوکوس بیماریزایی بیشتری دارد وجود ندارد (Yanong and Floyd, 2002). در زمان های مختلف، بیماریزایی استرپتوکوهای ماهی می تواند متفاوت باشد پس می توان فرض کرد که بیماری استرپتوکوکوزیس سندرمی است که بیش از یک گونه باکتری عامل آن است. البته تفاوت های جغرافیایی نیز در آن موثرند که در نقاط مختلف جهان گونه های متفاوتی عامل ایجاد بیماری اند (Eldar et al., 1999).

۴-۲- علائم کلینیکی و آسیب شناسی ناشی از استرپتوکوکوزیس

ماهیان مبتلا ممکن است یک یا بیشتر از یک علامت را نشان دهند، با توجه به گونه ماهی این علائم شامل: شنای نامنظم (چرخشی یا مارپیچی)، از دست دادن تعادل، بیحالی، تیرگی پوست، بیرون زدگی یک یا دو طرفه چشم، کدورت قرنیه، خونریزی داخل یا اطراف چشم‌ها، صفحه آبششی، پایه باله‌های شکمی و مخرجی، بالای سر و یا جاهای دیگر بدن، آب آوردگی شکم و زخم در پوست، اتساع محوطه بطنی، بزرگی و پر خونی طحال، رنگ پریدگی و بزرگ شدن کبد، پر خونی کلیه و در مواردی بروز خونریزی در سطح کبد و قلب مشاهده می شود. علاوه بر اینها زخم‌های خونریزی دهنده نیز در سطح بدن ممکن است مشاهده شود (Floyed و Yanong ۲۰۰۲، Salvador و همکاران ۲۰۰۵). در برخی موارد ممکن است که ماهی قبل از مرگ علائم آشکاری را نشان ندهد.



شکل ۳: تلفات و علائم مختلف مشاهده شده در ماهیان مبتلا به استرپتوکوکوزیس

تغییرات عمده آسیب شناسی باکتری استرپتوکوک در ماهی شامل پانوفتالمی و مننژیت می باشد. در دیگر اندامها تغییرات آسیب شناسی ناچیز می باشد (Eldar and Ghittino, 1999).

۵-۲- تلفات و خسارهای اقتصادی ناشی از استرپتوکوکوزیس

عفونتهای استرپتوکوکی می تواند سبب مرگ و میر بالایی (بیش از ۵۰٪) طی یک دوره ۳ تا ۷ روزه (Yanong and Floyd., 2002) و گاه حتی بیش از ۷۵٪ می شود (Eldar et al., 1997 و Bromage et al., 1999).

خسارت اقتصادی حاصله از تنها گونه *Streptococcus iniae* در آبی پروری بیش از ۱۰۰ میلیون دلار در سال تخمین زده شده است (Xu et al., 2007). گزارش بیماری از ایالات متحده آمریکا توسط plumb و همکاران در سال ۱۹۷۲ با تلفات بیش از ۵۰٪ در سواحل فلوریدا و خلیج مکزیکو صورت گرفت. پس از آن بیماری بصورت انفرادی یا همه گیری از ماهیان آب شیرین و دریایی در بسیاری مناطق از جمله آفریقای جنوبی، استرالیا، سنگاپور، انگلیس و نروژ، چین، ترکیه، اسپانیا، ایتالیا و کره اتفاق افتاده است (Deok-Chan Lee, et al., 2001). در ژاپن از سال ۱۹۷۴ به بعد موجب بروز خسارات فراوان اقتصادی بر صنعت گیش دم زرد (*Seriola quinqueradita*) پرورشی شده است. باکتری استرپتوکوکوس دارای قدرت تهاجمی بوده و در یک مطالعه آزمایشگاهی، ماهیان زینتی دانیوس راه راه را با غلظت زیادی از باکتری در آب وارد نموده و باعث مرگ ۱۰۰٪ ماهیان در عرض ۲ تا ۴ روز گردیدند.

در سالهای گذشته این بیماری در اغلب استانهای کشور (لرستان، مازندران، فارس، چهار محال و بختیاری، کرمانشاه، کهگیلویه و بویر احمد و گیلان) در ماهیان سردآبی پرورشی یک بیماری غالب بوده است و یکی از مشکلات جدی که منجر به خسارتهای سنگین اقتصادی در صنعت آبی پروری می شد، این بیماری بود (Akhlaghi and Keshavarzi 2002,; Soltani et al., 2005, 2008; Saeedi et al., 2009; Pourgholam et al., 2010). به جهت اهمیت بیماری استرپتوکوکوزیس در صنعت آبی پروری ماهیان سردآبی و خسارتهای اقتصادی ناشی از آن و گاه بسته شدن مزرعه به جهت انجام مقررات بهداشتی (قرنطینه) به وسیله واحدهای بهداشتی و نظارتی (سازمان دامپزشکی کشور) و گسترش و بروز آن در همه اقلیمهای سطح کشور، با شدت و حدت های مختلف ما را بر آن داشت تا در قالب یک طرح ملی (استانهای فارس، مرکزی، غرب و شرق استانهای مازندران) یک تصویری از عوامل تأثیرگذار بر بروز این بیماری داشته باشیم و با کنترل این عوامل بتوانیم نسبت به پیشگیری آن و با حداقل خسارت بر نامه ریزی داشته باشیم.

۶-۲- تاریخچه استرپتوکوکوزیس در ایران

وجود بیماری استرپتوکوکوزیس در ایران برای اولین بار با عاملیت باکتری *S. fecium* از یکی از مراکز تکثیر و پرورش قزل آلای رنگین کمان منطقه هراز در استان مازندران گزارش گردید (قیاسی و همکاران ۱۳۷۹) و بعد از آن بیماری با عاملیت *S. iniae* در استان فارس گزارش شد (اخلاقی و کشاورزی ۱۳۸۱) و بتدریج نه تنها بروز بیماری بلکه شیوع و تنوع عوامل ایجاد کننده آن نیز افزایش یافت. قلی پور کنعانی و همکاران (۱۳۸۶)، بروز استرپتوکوکوزیس را با جداسازی باکتری *S. fecium* از استان خراسان گزارش کرده است. در مطالعه دیگری در استان مازندران جداسازی *S. fecium* گزارش شده است (قیاسی و زاهدی ۱۳۸۶). سلطانی و نیکبخت بروجنی (۱۳۸۶) طی یک مطالعه اپیدمیولوژیکی دو ساله نشان دادند که استرپتوکوکوس اینیایی و لاکتوکوکوس گارویه دو باکتری بسیار مهم در برخی از مزارع پرورش قزل آلای رنگین کمان استانهای مطرح در تولید این ماهی در

ایران هستند. موسوی (۱۳۸۶) طی یک بررسی یک ساله از ۱۲ مزرعه تکثیر و پرورش ماهی قزل آلاي رنگين کمان در استان مازندران مبادرت به شناسايي باکترهاي گرم مثبت بيماريزا پرداخت. در اين بررسی پس از انجام آزمایشات بیوشیمیایی باکتریهای *S. milleri*، *S. agalactiae*، *S. iniae* و *Enterococcus fecalis* شناسایی شدند. در مطالعه‌ای دو ساله بر روی عوامل رایج استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس در استان فارس از ۴ مزرعه ۶۰۰ عدد ماهی واجد علائم بالینی نمونه برداری و از کلیه، مغز و کبد آنها کشت تهیه گردید. در مجموع ۴۸۰ پرگنه بدست آمد که از این تعداد ۳۹۰ نمونه *S. iniae* و ۹۰ نمونه *L. garvieae* شناسایی شدند (Soltani & Tarahomi ۲۰۰۹). در بررسی تعداد دیگری در استان اصفهان ۷۲ عدد ماهی با وزن ۲۰۰ - ۱۵۰ گرم واجد علائم بالینی از ۶ مزرعه پرورش قزل آلاي رنگين کمان نمونه برداری و در آزمایشگاه از کلیه و کبد آنها کشت میکروبی انجام دادند. از تمام نمونه های فوق باکتری استرپتوکوکوس جدا سازی شد (Moghadas و Mohammadi Arani ۲۰۰۹). در بررسی علل تلفات ایجاد شده در سه مزرعه پرورش قزل آلاي رنگين کمان با علایم بالینی مشکوک به استرپتوکوکوزیس در منطقه سندگان استان چهار محال و بختیاری پس از کشت و خالص سازی باکتری با استفاده از روش PCR و دو پرایمر pLG_1 و pLG_2 مشخص شد باکتری عامل بیماری *L. garvieae* بوده است (Fadaeifard و همکاران ۲۰۰۹). در بررسی دیگری بروز بیماری و تلفات در قزل آلاي رنگين کمان پرورشی ناشی از باکتری استرپتوکوکوس از استان همدان گزارش شده است (Habibipour و Bayat ۲۰۰۹). هوشمند و حقیقی (۱۳۸۸) در بررسی علل تلفات یک مزرعه پرورش قزل آلاي رنگين کمان در غرب استان گیلان توانستند باکتری *S. disgalactae* را جداسازی و شناسایی نمایند. در تحقیق دیگری وضعیت بیماری استرپتوکوکوزیس در استان کرمانشاه مورد بررسی قرار گرفت که طی آن از ۱۰۲ مزرعه پرورش ماهیان قزل آلاي رنگين کمان ۲۲ مزرعه واجد ماهیانی بودند که علائم بیماری را داشته و در بررسی های باکتری شناسی وجود باکتری استرپتوکوکوس اثبات شد (Shahbazian و همکاران ۲۰۱۰).

Heydarynezhad و همکاران (۲۰۱۰) در یک ارزیابی در بر پایه تکنیک های PCR و هیستوپاتولوژی به شناسایی عامل بروز استرپتوکوکوزیس در شهر ایلام پرداختند. در این بررسی بر پایه متد مولکولی باکتری بيماريزا در سه مزرعه پرورش قزل آلاي رنگين کمان در این شهرستان *L. garvieae* شناسایی شد. در یک مطالعه اپیدمیولوژی استرپتوکوکوزیس / لاکتوکوکوزیس در مراکز تکثیر و پرورش قزل آلا در ایران تعداد ۱۰۸ نمونه کوکسی گرم مثبت از ماهیان بیمار قزل آلاي رنگين کمان ۷ استان کشور طی سالهای ۲۰۰۹ - ۲۰۰۸ جمع آوری گردید. در بررسی اولیه از تستهای تفریقی و بیوشیمیایی ۴۹ نمونه ($45/37$) *S. iniae* و ۳۷ نمونه ($35/2$) *L. garvieae* و ۲۲ نمونه نیز استرپتوکوکوس با گونه نامشخص شناسایی گردید. لیکن در بررسی با روش PCR برای یافتن باند اختصاصی ۵۰۰ bp ، ۶۴ نمونه ($59/2$) *S. iniae* و ۴۴ نمونه ($40/8$) *L. garvieae* شناسایی شدند (Haghighi و Khiabania و همکاران ۲۰۱۰).

۳- مواد و روش کار

محل اجرا: شرق استان مازندران (رودخانه هراز)

استان مازندران در تولید ماهیان سردآبی (ماهی قزل آلا، رنگین کمان) بعد از استان چهارمحال بختیاری با تولید بیش از ۱۲ هزار تن و لرستان با تولید ۱۱ هزار تن، رتبه سوم تولید ماهیان سردآبی با ۱۰۵۱۴ تن را به خود اختصاص می دهد و استانهای آذربایجان غربی، بویر احمد و کهکولیه، کرمانشاه، فارس و تهران به ترتیب با بیش از ۶ هزار تن، ۵ هزار تن، ۴ هزار تن، در رتبه های چهارم تا هشتم قرار دارند.

رودخانه هراز یکی از پر آب ترین رودخانه های شمال ایران است و از ارتفاعات ۵۴۷۸ متری قله دماوند و کوههای پالان گران و امام زاده هاشم سرچشمه می گیرد. استفاده زراعی از آب این رودخانه برای ۷۲ هزار هکتار زمین شالیزاری، مهاجرت ماهیان استخوانی جهت تخمریزی طبیعی به این رودخانه و تولید بیش از ۴۵۰۰ تن ماهی قزل آلا، رنگین کمان با استفاده از آب این رودخانه بیانگر اهمیت آن در بهبود وضعیت اقتصادی منطقه است. این رودخانه از غرب به حوزه آلیس رود و از شرق به رودخانه گرم رود و بابلرود و از شمال به دریا محدود است و دارای هشت سر شاخه به نامهای: لار، زیار، لک رود، شیرکله، نمارستاق، نور، چلاو و منگل می باشد. طول رودخانه ۱۸۵ کیلومتر و پیرامون حوزه ۲۷۰ کیلومتری باشد. مساحت حوزه ۴۰۶۰ کیلومتر مربع و شیب بالادست رودخانه ۱۳-۱۲ درصد و متوسط شیب رودخانه ۲/۴ درصد و بارندگی متوسط حوزه ۸۳۲ میلی متر و کل جریان متوسط ۹۴۰ میلیون متر مکعب می باشد. بار رسوبی این رودخانه ۲۷۰.۴۳۰ تن در سال و فرسایش حدود ۱ درصد و بار جامد ۷۳ تن در کیلومتر مربع در سال برآورد می گردد. این رودخانه دارای رژیم برفی-یخچالی می باشد. عرض رودخانه از ۵۰-۵ متر در طول آن متغیر است. سرعت جریان آب، شیب بستر، کف سنگلاخی و دبی آب بالای رودخانه و اکسیژن محلول در آب از محسنات رودخانه هراز می باشد.



تصویر ماهواره ای از بخشی از رودخانه هراز

۱-۳- ایستگاههای منتخب (مزارع پرورش ماهی قزل آلاي رنگين کمان)

۹۴ درصد مزارع تکثیر و پرورش ماهیان سردآبی (قزل آلاي رنگين کمان) در شرق استان مازندران (منطقه هراز) که تقریباً همه تولید منطقه هراز (۴۵۰۰ تن) را به خود اختصاص می دهند ، در یک فاصله ۱۵ کیلومتری از هم واقع شده اند و به جز دو مزرعه اول و دوم (واسر و قزل سراب) که به شکل مستقل از رودخانه هراز آب می گیرند ، در بقیه مزارع ، خروجی آب مزرعه بالا دست بخشی ورودی آب مزرعه پایین دست می باشد. در این بررسی ۱۰ مزرعه انتخاب شد که مختصات جغرافیایی آنها به ترتیب از بالا به پایین در جدول شماره ۱ و تصاویر ماهواره ای مزارع در زیر آمده است . دو مزرعه اول (واسر) و آخر (قزل آلاي هراز) در ابتدا و انتهای این فاصله قرار دارند .

نام مزرعه	واسر	قزل سراب	قزل کاج	رنگین وانا	نگین هراز	چند منظوره نیاک	قزل نیاک	هزار یک	نل قزل	قزل آلاي هراز
ارتفاع از سطح دریا (متر)	۱۸۶۸	۱۸۶۸	۱۷۰۳	۱۷۰۳	۱۶۰۸	۱۶۸۶	۱۶۸۶	۱۶۵۷	۱۵۹۸	۱۴۵۷
طول جغرافیایی	۵۲.۱۲.۳۵	۵۲.۱۳.۵۷	۵۲.۱۸.۶۱	۵۲.۱۷.۵۷	۵۲.۲۱.۲۷	۵۲.۱۶.۵۸	۵۲.۱۸.۳۳	۵۲.۱۱.۴۵	۵۲.۲۱.۳۶	۵۲.۲۱.۵۸
عرض جغرافیایی	۳۵.۵۶.۲۲	۳۵.۴۶.۰۷	۳۵.۳۷.۱۴	۳۵.۴۷.۴۷	۳۵.۴۹.۵۴	۳۵.۵۷.۴۹	۳۵.۵۷.۶۲	۳۵.۵۳.۵۵	۳۵.۵۰.۱۸	۳۵.۵۳.۳۵

۲-۳- نمونه برداری

نمونه برداری از ماهی

نمونه برداری از ماهیان پیش پرواری و پرواری با دامنه وزنی (۵۰ - ۵۰۰ گرم) به تعداد ۷۱۸ عدد و بچه ماهیان با دامنه وزنی (۱۰ - ۵۰ گرم) به تعداد ۴۸۱ عدد ، بیمار (همراه با علائم) و به ظاهر سالم (بدون علائم) از ۱۰ مزرعه پرورش ماهی سردابی منتخب ، به شکل ماهیانه (مدت ۱۲ ماه) و هر ماه ۱۲۰ عدد ماهی (هر مزرعه ۱۰ عدد) به شکل زنده و تصادفی جمع آوری شد و مورد بررسیهای آزمایشگاهی (کشت باکتریایی) قرار گرفت. انجام کشت و تشخیص اولیه باکتری

پس از جمع آوری نمونه ها به شکل زنده ، ماهیان از نظر علایم ظاهری مورد بررسی قرار گرفتند و سپس در شرایط استریل کالبد گشایی شدند و پس از شکافتن محوطه بطني علائم داخلی ثبت شد و سپس با استفاده از آنس استریل از بافت های کبد و کلیه در محیط تریپتوکاز سوی آگار (TSA) کشت خطی ، جهت جداسازی باکتری انجام گردید (Austin و Austin ، ۱۹۹۹) و پلیت های کشت داده شده به مدت ۲۴ الی ۷۲ ساعت در دمای

۲۵ درجه سانتیگراد در گرمخانه کالبره شده قرار گرفتند و پس از مشاهده رشد باکتری (پرگنه ها) استرپتوکوک در محیط کشت ، تشخیص اولیه و افتراقی آن از باکتری استافیلوکوکوس با از رنگ آمیزی به روش گرم و دین کوکسی های گرم مثبت و تست کاتالاز (آزمایش افتراقی باکتری استرپتوکوک از استافیلوکوک) پس از رنگ آمیزی انجام گردید . پس تایید باکتری استرپتوکوک به وسیله تست کاتالاز ، نمونه های مثبت در کنار یخ به آزمایشگاه باکتریولوژی دارای گواهی استاندارد ایزو ۱۷۰۲۵ پژوهشگاه اکولوژی دریای خزر برای تعیین و شناسایی گونه منتقل گردید.

تشخیص تفریقی

برای تشخیص افتراقی استرپتوکوکها از روشهای بیوشیمیایی و آزمایشات متعددی انجام شد که به شرح ذیل می باشد (Murrey و همکاران ۲۰۰۳):

الف - تخمیر قند و تولید اسید از قند های (گلوکز ، سوربیتول ، آرابینوز ، تrehalose ، مانوز ، گزیلوز ، سالیسین ، نیوزیتول ، مالتوز و مانیتول) در این آزمایش توانایی باکتری در تولید اسید از ترکیبات هیدروکربنی (قند) مختلف سنجیده شد. در این روش چنانچه باکتری قابلیت تخمیر قند را داشته باشد بعلاوه تغییر pH (تولید اسید) رنگ محیط از قرمز به زرد تبدیل می شود. (Buller، ۲۰۰۴).

ب - آزمایش بایل آسکولین: محیط بایل آسکولین محیطی اختصاصی برای باکتریهای کاتالاز منفی است. این محیط اثر مهار کننده بر رشد اکثر باکتریهای گرم مثبت به جز انتروکوککها دارد. با رشد باکتری آسکولین به آسکولتین و دکستروز تبدیل می شود و اسکولتین تولید شده با کلرید آهن موجود در محیط واکنش داده و ایجاد رنگدانه سیاه میکند.

ج - رشد در حرارت ۱۰ و ۴۵ درجه سانتیگراد: رشد در دو حرارت ۱۰ و ۴۵ درجه سانتیگراد در محیط BHA در تشخیص تفریقی کوکسی های گرم مثبت کاتالاز منفی یک ابزار تشخیصی مهم است.

د - همولیز: قابلیت لیز گلبولهای قرمز از اهمیت خاصی در تشخیص تفریقی استرپتوکوکها برخوردار است. این واکنش با کشت باکتری در محیط حاوی ۵٪ خون گوسفند شناسایی می شود. از نقطه نظر هملیز باکتریها به چند دسته تقسیم می شوند که شامل:

- همولیز بتا: در این حالت گلبولهای قرمز بطور کامل تخریب شده و در اطراف پرگنه تولید شده یک هاله روشن ایجاد میشود.

- همولیز آلفا: در این حالت در اطراف پرگنه یک هاله تقریباً سبز رنگ در اطراف پرگنه مشاهده می شود.

- همولیز گاما: هیچگونه تغییری در اطراف پرگنه رشد یافته مشاهده نمی شود.

ه - آزمایش هیدرولیز هیپورات: تعدادی از باکتریها قابلیت تولید آنزیم هیپورات هیدرولاز را دارند که هیپوریت سدیم را به بنزوئیک اسید و گلی سین تجزیه می کند. افزودن کلرید آهن به بنزوئیک اسید موجب تشکیل رسوب قهوه ای رنگ بنزوات آهن می شود.

و - آزمایش حرکت: این آزمایش در خصوص حرکت باکتری در یک محیط نیمه جامد (ژل) است که تستی مفید در تشخیص تفریقی است. این آزمایش خصوصا در شناسایی انترکوکها مفید است.

ز - آزمایش مقاومت به نمک ۶/۵٪: بعضی از باکتریها قابلیت رشد در محیط حاوی ۶/۵٪ نمک طعام را دارند در حالیکه این غلظت اثر مهار کنندگی بر رشد دیگر باکتریها دارد.

ح - هیدرولیز اوره: اوره به عنوان منبع نیتروژن در باکتری هایی که اوره آز ایجاد می کنند می باشد و با مصرف اوره و تغییر در pH محیط اندیکاتور محیط (فیل رد) از قرمز به زرد تبدیل می شود.

ط - آزمایش VP (Voges - Proskauer): نتیجه انجام این واکنش تولید استیل متیل کرینول است. از این آزمایش در جهت تفریق جنس و گونه های مختلف کوکسیهای گرم مثبت استفاده می شود.

ی - هیدرولیز آرژنین: بعضی از باکتریها قابلیت هیدرولیز آرژنین را دارند. نتیجه این هیدرولیز قلیایی شدن محیط است که در نتیجه آن رنگ محیط تغییر می کند. این آزمایش برای تشخیص تفریقی باکتریها تست بسیار مناسبی است.

مشخصات بیوشیمیایی گونه های مختلف استرپتوکوک های در جدول ذیل نمایش داده شده است .

	St. faecium	St. uberis	St. agalactiae	St. dysgalactiae	St. iniae
Gram – staining	+	+	+	+	+
Catalase production	-	-	-	-	-
Haemolysis	α	-	-	+	+
Swarming	v	-	-	-	-
Production of ornithine decarboxylase	-	-	-	-	-
Production of lysine decarboxylase			-		
Production of arginine dihydrolase			-		
Motility test	+	+	+	+	+
Nitrate reduction			-		-
Indole production	-		-		
Citrate utilization	-		-		
Urease production	-			-	
Methyl red			+		-
Vogesproskauer reaction	+	+	+	-	-
Aesculin hydrolases	+	+	-	v	+
Degradation of gelatin	-		-		-
Onpg production	+	-	-		-
Oxidative-fermentative test	F	F	F	F	F
Acid production from arabinose	+	-	-	-	-
Acid production from glucose	+	+	+	+	+

Acid production from inositol	-	-	-		-
Acid production from maltose	+	+	+		+
Acid production from manitol	+	+	-	-	+
Acid production from mannose	+	+	+		+
Acid production from salicin	+	+	-	v	+
Acid production from sorbitol	-	+	-	-	-
Acid production from trehalose	+	+	+	+	+
Acid production from xylose	-	-	-		-
Growth at macconkey			-		
Temperature	10 ^{oC} -50 ^{oC}	10 ^{oC} -37 ^{oC}	25 ^{oC} -37 ^{oC}	25 ^{oC} -37 ^{oC}	10 ^{oC} -37 ^{oC}
Growth on NaCl	0-%6.5	0-%6.5	0-%3	0-%4	2-%4
Hipporatesudium	+	+	+	-	-

۳-۳- انجام آزمایشات مولکولی

استخراج DNA

استخراج DNA با بهینه سازی روش فنل - کلروفرم انجام گردیده است (Fevolden & Pogson, 1997).

الف - در این مرحله حدود ۵ کلنی با استفاده از آنس استریل از محیط کشت برداشته و به میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری حاوی ۵۰۰ میکرولیتر بافر متلاشی کننده (STE) منتقل کرده و در بن ماری ۳۷ °C به مدت یک شبانه روز قرار داده شد. Tris موجود در بافر نقش بافری دارد، EDTA به عنوان مهار کننده آنزیم های نوکلئاز و SDS موجود در آن نیز به عنوان حل کننده چربیهای موجود در غشاء سلول عمل می کند.

ب - پس از گرمخانه گذاری به تیوب به اندازه هم حجم مایع موجود (۵۰۰ میکرولیتر) فنل اضافه گردید و به شدت تکان داده شد و سپس با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط سانتریفوژ انجام گردید.

ج - سپس مایع شفاف رویی را به لوله اپندروف دیگری منتقل شده و هم حجم آن محلول کلروفرم اضافه گردید و پس از تکان دادن با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط سانتریفوژ انجام شد.

د - مجدداً مایع شفاف رویی برداشت و به اپندروف دیگری منتقل شده و یک دهم حجم آن نمک استات سدیم ۳ مولار و دو برابر حجم کل الکل مطلق سرد افزوده شد و به مدت نیم الی ۲ ساعت در فریزر ۲۰- قرار داده شد تا سرما به رسوب DNA کمک کند. پس از این مرحله تیوبها با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند.

ه - سپس مایع رویی تخلیه و رسوب حاصل با ۱۰۰ میکرولیتر الکل اتانل ۷۰٪ شستشو داده شد. این عمل به منظور حذف املاح از DNA صورت گرفت. پس از اضافه نمودن اتانل ۷۰٪، چند بار به انتهای اپندروف ضربه زده و سپس با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ گردید. و- بعد از سانتریفوژ مایع رویی تخلیه و اپندروف حاوی DNA به مدت ۲۰ دقیقه در هوای اتاق قرار گرفت تا اتانل موجود در آن کاملاً تبخیر گردید.

ز- پس از خشک شدن لوله ۳۰ میکرولیتر آب دیونیزه استریل به اپندروف اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد تا DNA موجود در ته لوله کاملاً در آب حل گردد، بدین ترتیب DNA خالص شده جهت انجام PCR به دست آمد.

تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده

جهت تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده و تعیین غلظت و خلوص DNA استخراجی از روش اسپکتروفتومتری استفاده گردید. به این منظور پس از کالیبره کردن دستگاه اسپکتروفتومتر CECIL (مدل DE ۲۰۴۰) با آب مقطر، ۲۰ میکرولیتر DNA ژنومی به وسیله آب مقطر به حجم ۳۰۰ μ L رسانده شد، مقدار جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۲۶۰ تا ۲۸۰ نانومتر و نسبت A260/280 به وسیله دستگاه اندازه گیری و ثبت شده و در پایان غلظت DNA با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

$$\text{غلظت DNA بر حسب ng/ml} = 50 \times D \times A260$$

$$A = \text{میزان جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر}$$

$$D = \text{نسبت رقت} = 60 = 3000/20$$

اگر نسبت جذب $A1/A2 = 1/8$ باشد، DNA مناسب است و اگر $A1/A2 > 1/8$ باشد، DNA دارای ناخالصی RNA است و اگر نسبت جذب $A1/A2 < 1/8$ باشد نشان دهنده ناخالصی با فنل و پروتئین است.

طراحی پرایمر

برای انجام واکنش PCR نیاز به پرایمرهای اختصاصی هر گونه بود، لذا برای طراحی پرایمر از توالی ژنهای 16S RNA و گلوکوکیناز گونه های مختلف استرپتوکوکوس استفاده شد. برای این منظور ۵ جفت پرایمر طراحی و ساخته شد.

با توجه به اینکه طراحی بعضی از پرایمرها به صورت کاملاً اختصاصی برای هر گونه با مشکل مواجه بود، از هضم آنزیمی با آنزیم های برش دهنده استفاده شده است. برای این منظور محصول PCR با پرایمر ENR را با آنزیم *XhoI* برش داده، در صورتیکه قطعه ای به طول ۱۶۳ جفت باز ایجاد گردد، نمونه مورد نظر *S. parauberis* است و در صورتیکه آنزیم *XhoI* بر روی محصول PCR محل قطع نداشته باشد، گونه *S. faecium* می باشد. همچنین محصول PCR ایجاد شده با پرایمر STRP اگر با آنزیم *DraIII* قطع گردد و قطعاتی به طول ۱۱۰ و ۱۵۰ جفت باز ایجاد شود، نمونه *S. dysgalactae* و اگر آنزیم با همین پرایمر محل قطع نداشت، نمونه *S. uberis* می باشد (جدول).

طول قطعات محصول PCR با استفاده از هر یک از پرایمرها

طول قطعات (جفت باز)						پرایمر
<i>S. iniae</i>	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>S. agalactiae</i>	<i>S. uberis</i>	<i>S. faecium</i>	<i>S. parauberis</i>	
-	۶۷۵	-	۶۷۵	۶۷۵	۶۷۵	Bac RNA
-	-	-	-	۵۴۰	۵۴۰	ENR
-	-	۴۳۰	-	-	-	STRA
-	۲۶۰	-	۲۶۰	-	-	STRP
۵۵۴	-	-	-	-	-	STRP1

انجام واکنش PCR

واکنش PCR با استفاده از ۵ µl بافر PCR (۱۰X)، dNTP با غلظت ۲۰۰ µM، ۱ واحد آنزیم Taq DNA polymerase، MgCl₂ با غلظت ۲/۵ mM، ۵۰ تا ۱۰۰ نانوگرم DNA هدف و آب مقطر به اندازه‌ای که حجم نهایی محلول واکنش به ۵۰ µl برسد، انجام شد. برنامه دستگاه ترمال سایکلر بترتیب واسرشته سازی (Denaturation)، ۹۴ درجه سانتیگراد بمدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمر (Annealing)، ۶۴ تا ۶۹ درجه سانتیگراد بمدت ۴۵ ثانیه و برای بسط واکنش (Extension) ۷۲ درجه سانتیگراد بمدت ۱ دقیقه برای ۳۰ چرخه بوده است. کمیت و کیفیت محصول PCR با استفاده از مارکر DNA ۵۰ pb و الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید ۸ درصد و رنگ آمیزی نترات نقره مشاهده و مورد بررسی قرار گرفت.

الکتروفورز محصول PCR با استفاده از ژل پلی اکریل آمید ۸ درصد

محصول PCR به روش الکتروفورز با ژل آگارز ۲ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت و اندازه قطعات حاصل از PCR با مقایسه با مارکر DNA (MBI Fermentas، pBR322 DNA/AluI Marker, 20,) بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸ درصد و با روش رنگ آمیزی نترات نقره بدست آمد. از آنجایی که حساسیت ژل پلی اکریل آمید ۲۰۰ تا ۳۰۰ برابر ژل آگارز می‌باشد. در تحقیق حاضر از این ژل برای بررسی نتایج PCR استفاده گردید. جهت تهیه ژل پلی اکریل آمید ۸ درصد ابتدا ۳۱ میلی لیتر آب مقطر را با ۱۳.۵ میلی لیتر پلی اکریل آمید ۳۰ درصد و ۴/۵ میلی لیتر بافر TBE (10X) در داخل بالن دارای بازوی جانبی مخلوط ریخته و به مدت ۴ دقیقه توسط دستگاه کمپرسور هواگیری شد و سپس ۳۸۵ میکرولیتر از محلول آمونیوم پرسولفات ۱۰ درصد و ۵۰ میکرولیتر از محلول TEMED به مخلوط قبلی اضافه شده این ترکیب در فضای بین دو شیشه که از طرفین و قسمت زیری مسدود و از قسمت بالایی نیز شانه‌ای را در فضای بین خود جا داده ریخته شد، جلوگیری از ایجاد حباب هوا در این مرحله کاملاً الزامی است. مدت زمان لازم برای پلیمریزه شدن این ژل حدود ۳۰ دقیقه بوده و بعد از این مدت شانه به آرامی از قسمت بالایی خارج و بعد از شستشوی چاهک‌های ایجاد شده توسط محلول TBE (1X) (بافر الکتروود)،

نمونه‌های PCR را به ترتیب در محل چاهک‌ها ریخته، و ژل در ستون عمودی بافر (1X) TBE قرار گرفت بطوری که ژل در بین دو مخزن بافر قرار گرفته و تنها ارتباط بین این دو بافر از طریق ژل میسر باشد. زمانی که دستگاه به مولد برق با ولتاژ ۱۵۰ ولت وصل می‌گردد به مخزن بالا قطب مثبت و به مخزن پایین قطب منفی وصل می‌شود که باعث برقراری جریان از سمت مخزن بالا به سمت مخزن پایین و حرکت نمونه‌های لود شده در چاهک در این مسیر می‌شود و قطعات DNA تکثیر شده براساس وزن مولکولی خود در طول ژل از هم جدا شوند، الکتروفورز نمونه‌ها در مدت ۳ ساعت انجام شد. جهت نمایان شدن باندهای DNA از روش رنگ آمیزی نیترات نقره استفاده شد و برای اطمینان از تکرارپذیری نوارها آزمایش سه الی چهار بار در شرایط یکسان تکرار گردید.

رنگ آمیزی ژل پلی‌اکریل‌آمید با نیترات نقره

جهت رنگ آمیزی ژل پلی‌اکریل‌آمید سه نوع محلول بصورت زیر تهیه شدند:

محلول A: بافر اسید استیک ۰/۵ درصد و اتانول ۱۰ درصد

اتانول ۴۰ میلی‌لیتر

اسید استیک ۲ میلی‌لیتر

آب مقطر ۳۶۰ میلی‌لیتر

محلول B، بافر نیترات نقره ۰/۱ درصد

نیترات نقره ۰/۲ گرم

آب مقطر ۲۰۰ میلی‌گرم

محلول C، بافر فرمالدئید ۰/۱۵ درصد، NaBH₄ ۰/۱ درصد و NaOH ۴/۵ درصد

NaOH ۴/۵ گرم

NaBH₄ ۰/۰۳ گرم

آب مقطر ۳۰۰ میلی‌لیتر

فرمالین ۱/۲ میلی‌لیتر

لازم به ذکر است که جهت تهیه محلول شماره ۳ (محلول C) ابتدا هیدروکسید سدیم را در آب مقطر حل و سپس مواد دیگر بر روی آنها ریخته می‌شود.

پس از اتمام زمان الکتروفورز ژل از صفحات شیشه‌ای با یک کاردک جدا و جهت رنگ آمیزی ابتدا دو بار و در هر بار به مدت ۳ دقیقه ژل در داخل محلول A بر روی شیکر قرار گرفت، سپس به مدت ۱۰ دقیقه به محلول B منتقل در پایان این مدت دو بار و هر بار بمدت ۱ دقیقه با آب مقطر شستشو شد. در نهایت بمدت ۱۰ دقیقه یا تا زمانی که باندها بصورت نوارهای تیره رنگی دیده شوند در محلول C قرار داده شد. ژلهای رنگ آمیزی شده به درون پوشش پلاستیکی منتقل و جهت نگهداری پرس شدند.

ثبت تصاویر

تصاویر ژل پلی اکریل آمید پس از رنگ آمیزی ابتدا توسط دستگاه مستند سازی ژل ترانس ایلومیناتور مدل DOC008.XD ساخت کمپانی UVI همراه با برنامه نرم افزاری UVI DOC Version V.99.04 ثبت و ذخیره گردید.

هضم آنزیمی محصول PCR

برای هضم آنزیمی محصول PCR مقدار ۵-۸ μl از محصول PCR را در یک میکروتیوپ ۵۰۰ میکرولیتری ریخته و مقدار ۱ μl آنزیم محدودگرو ۲ μl بافر آنزیم به آن اضافه و سپس با dH₂O حجم نهایی به ۲۰ μl رسانده شد. سپس لوله ها بمدت ۳-۲ ساعت در حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از این مدت، کلیه نمونه ها با استفاده از ژل پلی اکریل آمید ۶ درصد، همراه با مارکر DNA ۵۰bp الکتروفورز و الگوهای هضم آنزیمی محصولات PCR با رنگ آمیزی نترات نقره قابل مشاهده گردیدند.

نمونه برداری از آب

۳-۴- آزمایش های فیزیکوشیمیایی آب

قبل از نمونه برداری از آب با استفاده از دستگاه دیجیتال آنالیز آب، درجه حرارت، pH و میزان اکسیژن محلول آب ورودی مزارع منتخب، اندازه گیری و ثبت می شد. ماهیانه در طی ۱۲ ماه از آب ورودی هر مزرعه یک نمونه آب در ظرف پلاستیکی به حجم ۲۵۰ سی سی پس از ثبت اطلاعات اولیه (تاریخ، نام مزرعه و درجه حرارت) اخذ و در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل می گردید و پارامترهایی مثل نیتريت به روش برن شنایدر و رابینسون با اضافه نمودن محلول های سولفانیل آمید و N-(۱-فنیل) اتیلن دی آمین دی هیدروکلراید، یون نیتريت موجود ایجاد کمپلکس رنگی نمود که میزان جذب آن در طول موج ۵۴۳ نانومتر اندازه گیری شد. نترات به روش ستون کاهشی کادمیوم اندازه گیری شد (آرسترونگو-ریچادمو، ۱۹۶۸). ابتدا با عبور نمونه از ستون کاهشی کادمیوم، یون نترات به نیتريت تبدیل گردید و سپس طبق روش اندازه گیری یون نیتريت، انجام و در انتها میزان بدست آمده از غلظت NO₂- اولیه کم شد. مقدار اسیدیته آب، به کمک pH متر پرتابل با الکترو د حساس مدل 320-WTW تعیین گردید، آمونیوم به روش فنات اندازه گیری شد (سیرژی_سولورزانو، ۱۹۶۹). یون NH₄⁺ موجود در نمونه مورد نظر با اضافه نمودن محلول های فنل و هیپو کلریت کلسیم ایجاد کمپلکس پایداري به رنگ آبی می نماید که جذب آن در طول موج ۶۳۰ nm قرائت گردید. کدورت (کل مواد جامد محلول (TDS) به روش دستگاهی مدل HACH اندازه گیری شد و اکسیژن محلول به روش وینکلر اندازه گیری گردید. نمونه مورد نظر در محل و در داخل شیشه های وینکلر جمع آوری گردیده و با افزودن محلول های یدور قلیایی و کلرور منگان تثبیت شدند. سپس با انحلال رسوب حاصل توسط اسید سولفوریک محلول توسط EDTA دی سدیک در مجاورت چسب نشاسته تیر و اندازه گیری شد و دمای آب با استفاده از ترمومتر جیوه ای بر حسب سانتی گراد اندازه گیری شد.

شمارش کلی باکتریهای داخل آب

نمونه برداری از آب ورودی هر مزرعه با استفاده از ظرف پلاستیکی استریل درب دار با حجم ۷۰ میلی لیتر صورت گرفت و نمونه ها در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل گردید. بعد از تهیه رقتهای سریالی (10^{-1} ، 10^{-2} ، 10^{-3}) به روش پورپلیت در محیط TSA (Merck آلمان) کشت به عمل آمد. پلیتها به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند (گرمخانه کالیبره شده با استاندارد ایزو ۱۷۰۲۵). پس از این مدت شمارش کلی باکتریها انجام گردید. جهت تشخیص جنس باکتری استرپتوکوکوس در پلیتهای فوق، ابتدا از پرگنه های تیپیک نمونه برداری و به روش خطی در محیط آگار خوندار (BA) (Merck آلمان) کشت خالص به عمل آمد. سپس نمونه ها به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۰-۲۵ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند و پس از طی این مدت از کلنی های تک بدست آمده رنگ آمیزی گرم انجام گردید. بعد از این مرحله و تایید کلنی های استرپتوکوکوسی و شباهت آن با استافیلوکوک ها در نوع رنگ پذیری و شکل، تست افتراقی کاتالاز گذاشته شد و همه آنها را که تست کاتالاز منفی بودند، به عنوان استرپتوکوک پذیرفته شد (Buller ۲۰۰۴).

روش تجزیه و تحلیل داده ها

داده ها و آمار توصیفی با برنامه SPSS تحلیل و پردازش گردیدند. از آزمونهای ANOVA و برای مقایسه از آزمون دانکن استفاده شد. از تست های نا پارامتریک مثل آزمون کای مربع مقایسه ی نسبت ها نیز استفاده گردید. همچنین از آزمون Kruskal Wallis و Logistic Regresion استفاده شده است. میزان معنی دار بودن در سطح $P < 0.05$ ارائه شد. برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel 2007 استفاده شد.

۴- نتایج

۴-۱- علائم داخلی و خارجی مشاهده شده در ماهیان مورد بررسی (قبل از باز کردن و بعد از باز کردن ماهی)

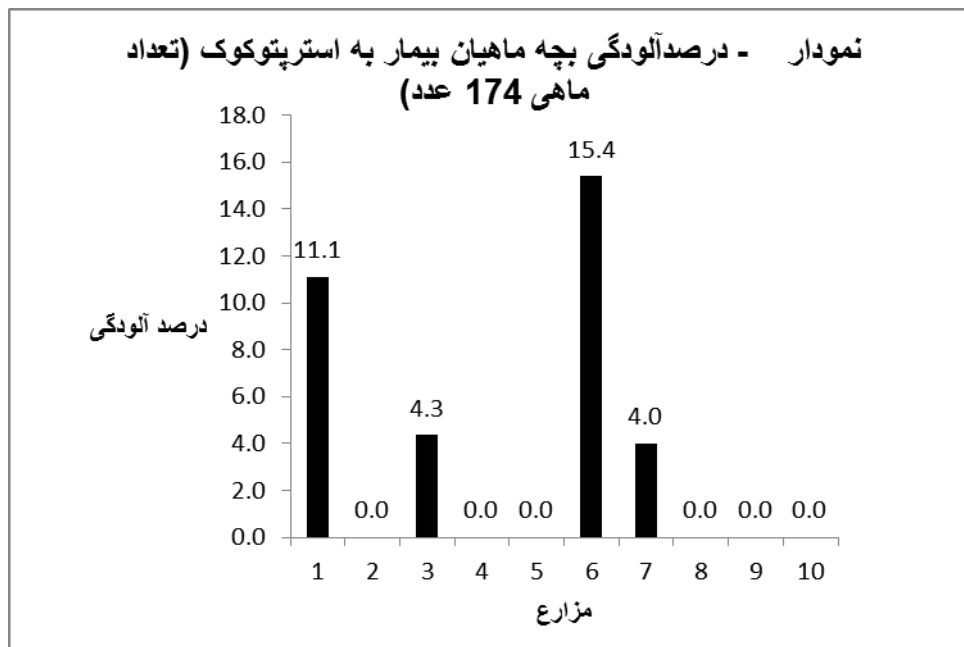
در ماهیان مورد بررسی تنوعی از علائم غیر طبیعی مشاهده گردید که بعضاً این موارد بصورت مشترک در ماهیان بیر دیده نشده است و این علائم عبارت بودند از : شنای نامنظم (چرخشی یا مارپیچی)، از دست دادن تعادل، بیحالی، تیرگی پوست، بیرون زدگی یک یا دو طرفه چشم، کدورت قرنیه، خون ریزی اطراف چشم ها، صفحه آبششی، پایه باله های شکمی و مخرجی، بالای سر و یا جاهای دیگر بدن، آب آوردگی شکم و زخم در پوست، اتساع محوطه بطنی، بزرگی و پر خونی طحال، رنگ پریدگی و بزرگ شدن کبد، پر خونی کلیه و در مواردی بروز خونریزی در سطح کبد و قلب مشاهده شد.

از بافت کلیه ۴.۶ درصد از ۱۷۴ عدد بچه ماهی بیمار و ۸.۹ درصد از ۲۳۵ عدد ماهی پروراری بیمار باکتری استرپتوکوک جدا سازی گردید و بقیه نمونه ها به ترتیب ۹۵.۴ و ۹۱.۱ درصد از نظر استرپتوکوک منفی بودند، هر چند که از ۰.۷ درصد از ۳۰۷ عدد بچه ماهی سالم (جدول شماره ۱) و ۱ درصد از ۴۸۳ عدد ماهی پروراری سالم که فاقد هرگونه علائم غیر طبیعی بودند (جدول شماره ۲) باکتری استرپتوکوکوس جدا سازی شد.

جدول شماره ۱: درصد آلودگی بچه ماهیان بیمار و سالم به استرپتوکوکوس

شماره مزرعه	تعداد بچه ماهی بیمار	بچه ماهی بیمار (۱۷۴)		تعداد بچه ماهی سالم	بچه ماهی سالم (۳۰۷)	
		درصد آلودگی به باکتری استرپ	درصد فاقد آلودگی به باکتری استرپ		درصد آلودگی به باکتری استرپ	درصد فاقد آلودگی به باکتری استرپ
۱	۱۸	۱۱.۱	۸۸.۹	۴۶	۰.۰	۱۰۰.۰
۲	۱۸	۰.۰	۱۰۰.۰	۳۸	۰.۰	۱۰۰.۰
۳	۲۲	۴.۳	۹۵.۷	۳۱	۰.۰	۱۰۰.۰
۴	۲۱	۰.۰	۱۰۰.۰	۲۲	۰.۰	۱۰۰.۰
۵	۲۰	۰.۰	۱۰۰.۰	۳۱	۳.۲	۹۶.۸
۶	۲۶	۱۵.۴	۸۴.۶	۱۴	۰.۰	۱۰۰.۰
۷	۲۵	۴.۰	۹۶.۰	۲۸	۰.۰	۱۰۰.۰
۸	۱۱	۰.۰	۱۰۰.۰	۳۶	۲.۸	۹۷.۲
۹	۴	۰.۰	۱۰۰.۰	۳۱	۰.۰	۱۰۰.۰
۱۰	۸	۰.۰	۱۰۰.۰	۳۰	۰.۰	۱۰۰.۰
درصد کل	۱۷۴	۴.۶	۹۵.۴	۳۰۷	۰.۷	۹۹.۳

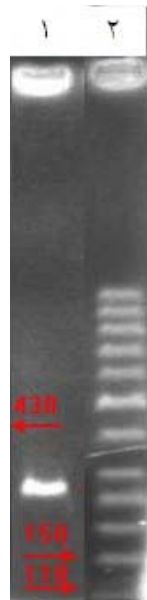
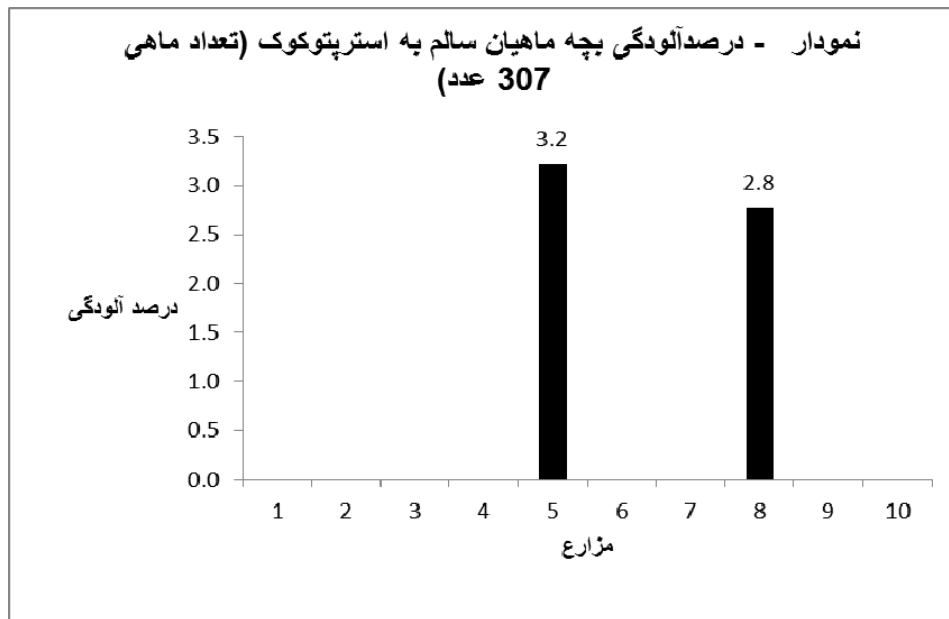
بیشترین درصد آلودگی بچه ماهیان بیمار به استرپتوکوک به ترتیب ۱۵/۴، ۱۱/۱، ۴/۳ و ۴ درصد و در مزارع ۶، ۱، ۷ و ۳ مشاهده گردید و و در ۶ مزرعه دیگر دیده نشد و بیشترین درصد آلودگی در بچه ماهیان سالم به ترتیب ۳/۲ و ۲/۸ درصد در مزارع ۵ و ۸ و در ۸ مزرعه دیگر مشاهده نشد (جدول شماره ۱)



جدول شماره ۲: درصد آلودگی ماهیان پرورشی بیمار و سالم به استرپتوکوکوس

شماره مزرعه	تعداد ماهی پرورشی بیمار در هر مزرعه	ماهی پرورشی بیمار (۲۳۵)		ماهی پرورشی سالم (۴۸۳)	
		درصد آلودگی به استرپ	درصد فاقد آلودگی به استرپ	درصد آلودگی به استرپ	درصد فاقد آلودگی به استرپ
۱	۱۵	۰	۱۰۰.۰	۰.۰	۱۰۰.۰
۲	۱۰	۱۰.۰	۹۰.۰	۰.۰	۱۰۰.۰
۳	۲۰	۳۵.۰	۶۵.۰	۲.۲	۹۷.۸
۴	۳۳	۳.۰	۹۷.۰	۰.۰	۱۰۰.۰
۵	۳۳	۱۲.۱	۸۷.۹	۸.۳	۹۱.۷
۶	۲۹	۰.۰	۱۰۰.۰	۰.۰	۱۰۰.۰
۷	۳۱	۰.۰	۱۰۰.۰	۰.۰	۱۰۰.۰
۸	۲۶	۱۱.۵	۸۸.۵	۰.۰	۱۰۰.۰
۹	۱۷	۵.۹	۹۴.۱	۱.۵	۹۸.۵
۱۰	۲۱	۱۹.۰	۸۱.۰	۰.۰	۱۰۰.۰
درصد کل	۲۳۵	۸.۹	۹۱.۱	۱.۰	۹۹.۰

بیشترین درصد آلودگی ماهیان پروراری بیمار به استرپتوکوک به ترتیب ۳۵، ۱۹، ۱۲/۱، ۱۱/۵، ۱۰، ۵/۹ و ۳ درصد و در مزارع ۳، ۱۰، ۵، ۸، ۲، ۹، ۴ مشاهده گردید و در ۳ مزرعه دیگر دیده نشد و بیشترین درصد آلودگی در ماهیان پروراری سالم به ترتیب ۸/۳، ۲/۲ و ۱/۵ درصد در مزارع ۵، ۳ و ۹ و در ۷ مزرعه دیگر مشاهده نشد (جدول شماره ۱)



تصویر شماره ۱: نتیجه PCR شناسایی گونه استرپتوکوک کوک جداسازی شده از نمونه های آلوده

چاهک ۱ = مارکر

چاهک ۲ = نمونه مثبت استرپتوکوک یو بریس

۲-۴- برخی پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب (عوامل خطر) در بروز استرپتوکوکوزیس

جدول شماره ۳ : میانگین برخی پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب مزرعه شماره ۱

فصل	Nitrite(mg/l)	Nitrate(mg/l)	NH ₄ ⁺ (mg/l)	TDS(g/l)	DO(mg/l)	Temperature(°C)	pH
بهار	0.004±0.003	0.764±0.094	0.296±0.369	0.187±0.013	9.510±0.26	10.90±0.91	8.48±0.22
تابستان	0.002±0.003	0.507±0.331	0.029±0.031	0.221±0.091	8.117±0.85	13.20±1.20	8.02±0.44
پائیز	0.001±0.001	0.558±0.122	0.078±0.048	0.173±0.013	8.857±0.39	10.93±1.82	8.35±0.04
زمستان	0.020±0.011	0.888±0.166	0.066±0.035	0.190±0.025	9.590±0.04	7.57±0.77	8.33±0.10
میانگین کل سال	0.007±0.009	0.681±0.250	0.118±0.214	0.193±0.050	9.026±0.76	10.63±2.36	8.30±0.30

در مزرعه شماره ۱ (اولین مزرعه منطقه هراز از جنوب به شمال)، دامنه میانگین میزان نیتريت حد اقل ۰/۰۰۱، در فصل پاییز و حد اکثر ۰/۰۰۲ میلی گرم در لیتر در فصل زمستان، نیترات حد اقل ۰/۱۲۲ در فصل بهار و حد اکثر ۰/۸۸۸ میلی گرم در تابستان، یون آمونیوم حد اقل ۰/۰۲۹ در فصل تابستان و حد اکثر ۰/۲۹۶ میلی گرم در فصل بهار، مواد جامد محلول حد اقل ۰/۱۷۳ در فصل پاییز، حد اکثر ۲۲۱/ میلی گرم در فصل تابستان، اکسیژن حد اقل ۸/۱۱۷ در فصل تابستان، حد اکثر ۹/۵۹۰ میلی گرم در لیتر، درجه حرارت حد اقل ۷/۵۷ درجه سانتی گراد در زمستان و حد اکثر ۱۳/۲۰ درجه سانتی گراد در فصل تابستان و پ هاش حد اقل ۸/۰۲ در تابستان و حد اکثر ۸/۴۸ در بهار تعیین گردید مشاهده گردید.

جدول شماره ۴ : میانگین برخی پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب مزرعه شماره مزرعه شماره ۲

فصل	Nitrite(mg/l)	Nitrate(mg/l)	NH ₄ ⁺ (mg/l)	TDS(g/l)	DO(mg/l)	Temperature(°C)	pH
بهار	0.009±0.003	0.819±0.066	0.076±0.046	0.213±0.017	9.18±0.21	11.60±1.32	8.54±0.20
تابستان	0.004±0.004	0.660±0.513	0.024±0.031	0.160±0.036	8.45±0.48	12.73±0.21	8.36±0.16
پائیز	0.001±0.001	0.567±0.106	0.058±0.031	0.193±0.029	8.61±0.56	10.57±1.56	8.26±0.20
زمستان	0.017±0.009	0.823±0.089	0.064±0.014	0.240±0.065	9.46±0.14	8.50±1.01	8.55±0.08
میانگین کل سال	0.008±0.008	0.717±0.286	0.056±0.037	0.202±0.050	8.92±0.56	10.85±1.93	8.43±0.20

در مزرعه شماره ۲، دامنه میانگین میزان نیتريت، حد اقل ۰/۰۰۱ و در فصل پاییز و حد اکثر ۰/۰۱۷ میلی گرم در لیتر در فصل زمستان، نترات حد اقل ۰/۵۶۷ در فصل پاییز و حد اکثر ۰/۸۲۳ میلی گرم در زمستان، یون آمونیوم، حد اقل ۰/۰۲۴ در فصل تابستان و حد اکثر ۰/۰۷۶ میلی گرم در فصل بهار، مواد جامد محلول، حد اقل ۰/۱۶۰ در فصل تابستان، حد اکثر ۲۴۰/ میلی گرم در فصل زمستان، اکسیژن، حد اقل ۸/۴۵ در فصل تابستان، حد اکثر ۹/۴۶ میلی گرم در لیتر، درجه حرارت، حد اقل ۸/۵۰ درجه سانتی گراد در زمستان و حد اکثر ۱۲/۷۳ درجه سانتی گراد در فصل تابستان و پ هاش، حد اقل ۸/۲۶ در پاییز و حد اکثر ۸/۵۵ در زمستان تعیین گردید مشاهده گردید.

جدول شماره ۵: میانگین برخی پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب مزرعه شماره ۳

فصل	Nitrite(mg/l)	Nitrate(mg/l)	NH ₄ ⁺ (mg/l)	TDS(g/l)	DO(mg/l)	Temperature(°C)	pH
بهار	0.006±0.001	0.701±0.116	0.067±0.023	0.200±0.017	9.28±0.18	11.60±1.64	8.38±0.03
تابستان	0.004±0.005	0.812±0.350	0.127±0.113	0.180±0.052	8.76±0.14	14.43±0.67	8.48±0.11
پائیز	0.001±0.000	0.678±0.148	0.071±0.021	0.217±0.013	9.35±0.33	10.40±1.73	8.45±0.04
زمستان	0.034±0.034	1.146±0.464	0.111±0.034	0.263±0.098	9.88±0.51	7.87±1.00	8.38±0.14
میانگین کل سال	0.011±0.022	0.834±0.355	0.094±0.065	0.215±0.064	9.32±0.51	11.08±2.71	8.42±0.10

در مزرعه شماره ۳، دامنه میانگین میزان نیتريت، حد اقل ۰/۰۰۱ در فصل پاییز و حد اکثر ۰/۰۳۴ میلی گرم در لیتر در فصل زمستان، نترات حد اقل ۰/۶۷۸ در فصل پاییز و حد اکثر ۱/۱۴۶ میلی گرم در زمستان، یون آمونیوم، حد اقل ۰/۰۶۷ در فصل بهار و حد اکثر ۰/۱۱۱ میلی گرم در فصل زمستان، مواد جامد محلول، حداقل ۰/۲۶۳ در فصل زمستان، حد اکثر ۰/۱۸۰ میلی گرم در فصل تابستان، اکسیژن، حد اقل ۹/۸۸ در فصل زمستان، حد اکثر ۹/۲۸ میلی گرم در لیتر، درجه حرارت، حد اقل ۷/۸۷ درجه سانتی گراد در زمستان و حد اکثر ۱۴/۴۳ درجه سانتی گراد در فصل تابستان و پ هاش، حد اقل ۸/۳۸ در پاییز و زمستان و حد اکثر ۸/۴۸ در تابستان تعیین گردید مشاهده گردید.

جدول شماره ۶: میانگین برخی پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب مزرعه شماره ۴

فصل	Nitrite(mg/l)	Nitrate(mg/l)	NH ₄ ⁺ (mg/l)	TDS(g/l)	DO(mg/l)	Temp(°C)	pH
بهار	0.007±0.001	0.787±0.033	0.071±0.016	0.223±0.017	9.38±0.23	10.97±1.61	8.51±0.04
تابستان	0.009±0.007	0.788±0.248	0.051±0.043	0.180±0.052	8.79±0.12	13.60±0.58	8.40±0.17
پائیز	0.001±0.001	0.660±0.180	0.168±0.109	0.197±0.005	9.56±0.60	9.90±2.73	8.44±0.19
زمستان	0.029±0.033	0.955±0.131	0.146±0.121	0.253±0.055	10.17±0.23	6.40±0.91	7.40±0.80
میانگین کل سال	0.011±0.020	0.798±0.196	0.109±0.097	0.213±0.048	9.47±0.60	10.22±3.08	8.19±0.62

در مزرعه شماره ۴، دامنه میانگین میزان نیتريت، حد اقل ۰/۰۰۱ در فصل پاییز و حد اکثر ۰/۰۲۹ میلی گرم در لیتر در فصل زمستان، نترات حد اقل ۰/۶۶۰ در فصل پاییز و حد اکثر ۰/۹۵۵ میلی گرم در زمستان، یون آمونیوم، حد اقل ۰/۰۵۱ در فصل تابستان و حد اکثر ۰/۱۶۸ میلی گرم در فصل پائیز، مواد جامد محلول، حداقل ۰/۱۸۰ در فصل تابستان، حد اکثر ۰/۲۵۳ میلی گرم در فصل زمستان، اکسیژن، حد اقل ۸/۷۹ در فصل تابستان، حد اکثر ۱۰/۱۷ میلی گرم در لیتر در فصل زمستان، درجه حرارت، حد اقل ۶/۴۰ درجه سانتی گراد در زمستان و حد اکثر ۱۳/۶۰ درجه سانتی گراد در فصل تابستان و پ هاش، حد اقل ۷/۴۰ در زمستان زمستان و حد اکثر ۸/۵۱ در تابستان مشاهده گردید.

جدول شماره ۷: میانگین برخی پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب مزرعه شماره مزرعه شماره ۵

فصل	Nitrite(mg/l)	Nitrate(mg/l)	NH4+(mg/l)	TDS(g/l)	DO(mg/l)	Temp(°C)	pH
بهار	0.009±0.004	0.743±0.092	0.082±0.030	0.220±0.008	9.29±0.20	11.53±1.60	8.74±0.22
تابستان	0.015±0.015	0.930±0.239	0.076±0.019	0.203±0.017	8.51±0.22	14.60±0.87	8.45±0.16
پائیز	0.001±0.001	0.404±0.326	0.204±0.133	0.227±0.027	9.46±0.35	9.97±1.50	7.66±0.09
زمستان	0.019±0.008	1.049±0.257	0.088±0.028	0.233±0.055	9.71±0.40	7.67±1.08	8.45±0.27
میانگین کل سال	0.011±0.011	0.782±0.343	0.113±0.087	0.221±0.034	9.24±0.54	10.94±2.84	8.33±0.45

در مزرعه شماره ۵، دامنه میانگین میزان نیتريت، حد اقل ۰/۰۰۱ در فصل پاییز و حد اکثر ۰/۰۱۹ میلی گرم در لیتر در فصل زمستان، نترات حد اقل ۰/۴۰۴ در فصل پاییز و حد اکثر ۱/۰۴۹ میلی گرم در زمستان، یون آمونیوم، حد اقل ۰/۰۷۶ در فصل تابستان و حد اکثر ۰/۲۰۴ میلی گرم در فصل پائیز، مواد جامد محلول، حداقل ۰/۲۰۳ در فصل تابستان، حد اکثر ۰/۲۳۳ میلی گرم در فصل زمستان، اکسیژن، حد اقل ۸/۵۱ در فصل تابستان، حد اکثر ۹/۷۱ میلی گرم در لیتر در فصل زمستان، درجه حرارت، حد اقل ۷/۶۷ درجه سانتی گراد در زمستان و حد اکثر ۱۴/۶۰ درجه سانتی گراد در فصل تابستان و پ هاش، حد اقل ۷/۶۶ در پائیز و حد اکثر ۸/۷۴ در بهار مشاهده گردید.

جدول شماره ۸: میانگین برخی پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب مزرعه شماره مزرعه شماره ۶.

فصل	Nitrite(mg/l)	Nitrate(mg/l)	NH ₄ ⁺ (mg/l)	TDS(g/l)	DO(mg/l)	Temp.(°C)	pH
بهار	0.004±0.002	0.779±0.047	0.084±0.031	0.220±0.029	9.06±0.23	11.10±1.44	8.73±0.19
تابستان	0.010±0.010	0.791±0.068	0.053±0.035	0.213±0.010	8.78±0.08	14.13±0.77	8.26±0.47
پائیز	0.003±0.003	0.424±0.304	0.098±0.065	0.217±0.013	9.29±0.20	10.40±1.95	8.47±0.08
زمستان	0.027±0.017	0.903±0.157	0.097±0.017	0.183±0.047	10.07±0.41	5.87±0.70	8.02±0.59
میانگین کل سال	0.011±0.014	0.724±0.251	0.083±0.044	0.208±0.032	9.30±0.55	10.38±3.24	8.37±0.47

در مزرعه شماره ۶، دامنه میانگین میزان نیتريت، حد اقل ۰/۰۰۴ در فصل بهار و حد اکثر ۰/۰۲۷ میلی گرم در لیتر در فصل زمستان، نترات حد اقل ۰/۴۲۴ در فصل پاییز و حد اکثر ۰/۹۰۳ میلی گرم در زمستان، یون آمونیوم، حد اقل ۰/۰۵۳ در فصل تابستان و حد اکثر ۰/۰۹۸ میلی گرم در فصل پائیز، مواد جامد محلول، حد اقل ۰/۱۸۳ در فصل زمستان، حد اکثر ۰/۲۲۰ میلی گرم در فصل بهار، اکسیژن، حد اقل ۸/۷۸ در فصل تابستان، حد اکثر ۱۰/۰۷ میلی گرم در لیتر در فصل زمستان، درجه حرارت، حد اقل ۵/۸۷ درجه سانتی گراد در زمستان و حد اکثر ۱۴/۱۳ درجه سانتی گراد در فصل تابستان و پ هاش، حد اقل ۸/۰۲ در پائیز و حد اکثر ۸/۴۷ در بهار مشاهده گردید.

جدول شماره ۹: میانگین برخی پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب مزرعه شماره ۷.

فصل	Nitrite(mg/l)	Nitrate(mg/l)	NH ₄ ⁺ (mg/l)	TDS(g/l)	DO(mg/l)	Temp.(°C)	pH
بهار	0.006±0.001	0.877±0.070	0.091±0.023	0.213±0.025	9.17±0.06	12.17±1.63	8.60±0.12
تابستان	0.013±0.010	0.858±0.351	0.061±0.054	0.180±0.022	8.73±0.19	13.90±0.58	8.05±0.31
پائیز	0.015±0.009	0.444±0.343	0.196±0.136	0.223±0.021	9.53±0.70	9.30±2.45	8.35±0.12
زمستان	0.048±0.041	1.122±0.345	0.164±0.101	0.210±0.030	9.93±0.50	6.77±1.13	8.19±0.43
میانگین کل سال	0.020±0.027	0.825±0.385	0.128±0.104	0.207±0.029	9.34±0.62	10.53±3.16	8.30±0.34

در مزرعه شماره ۷، دامنه میانگین میزان نیتريت، حد اقل ۰/۰۰۶ در فصل بهار و حد اکثر ۰/۰۴۸ میلی گرم در لیتر در فصل زمستان، نترات حد اقل ۰/۴۴۴ در فصل پاییز و حد اکثر ۱/۱۲۲ میلی گرم در زمستان، یون آمونیوم، حد اقل ۰/۰۶۱ در فصل تابستان و حد اکثر ۰/۱۹۶ میلی گرم در فصل پائیز، مواد جامد محلول، حداقل ۰/۱۸۰ در فصل تابستان، حد اکثر ۰/۲۲۳ میلی گرم در فصل پائیز، اکسیژن، حد اقل ۸/۷۳ در فصل تابستان، حد اکثر ۹/۹۳ میلی گرم در لیتر در فصل زمستان، درجه حرارت، حد اقل ۵/۸۷ درجه سانتی گراد در زمستان و حد اکثر ۱۴/۱۳ درجه سانتی گراد در فصل تابستان و پ هاش، حد اقل ۸/۰۵ در تابستان و حد اکثر ۸/۶۰ در بهار مشاهده گردید.

جدول شماره ۱۰: میانگین برخی پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب مزرعه شماره ۸

فصل	Nitrite(mg/l)	Nitrate(mg/l)	NH4+(mg/l)	TDS(g/l)	DO(mg/l)	Temp.(°C)	pH
بهار	0.027±0.028	0.811±0.071	0.089±0.019	0.223±0.029	9.15±0.43	10.13±0.84	8.95±0.62
تابستان	0.010±0.009	0.840±0.079	0.065±0.034	0.200±0.017	8.49±0.35	15.37±1.00	8.55±0.14
پائیز	0.002±0.000	0.528±0.345	0.125±0.084	0.213±0.019	9.50±0.54	9.64±2.34	8.43±0.19
زمستان	0.028±0.017	1.030±0.260	0.086±0.013	0.250±0.055	10.20±0.29	7.37±0.60	8.24±0.89
میانگین کل سال	0.016±0.020	0.802±0.284	0.091±0.051	0.222±0.038	9.33±0.74	10.63±3.24	8.54±0.61

در مزرعه شماره ۸، دامنه میانگین میزان نیتريت، حد اقل ۰/۰۰۲ در فصل پائیز و حد اکثر ۰/۰۲۸ میلی گرم در لیتر در فصل زمستان، نترات حد اقل ۰/۵۲۸ در فصل پاییز و حد اکثر ۱/۰۳۰ میلی گرم در زمستان، یون آمونیوم، حد اقل ۰/۰۶۵ در فصل تابستان و حد اکثر ۰/۱۲۵ میلی گرم در فصل پائیز، مواد جامد محلول، حداقل ۰/۲ در فصل تابستان، حد اکثر ۰/۲۵۰ میلی گرم در فصل زمستان، اکسیژن، حد اقل ۸/۴۹ در فصل تابستان، حد اکثر ۱۰/۲۰ میلی گرم در لیتر در فصل زمستان، درجه حرارت، حد اقل ۷/۳۷ درجه سانتی گراد در زمستان و حد اکثر ۱۵/۳۳ درجه سانتی گراد در فصل تابستان و پ هاش، حد اقل ۸/۲۴ در زمستان و حد اکثر ۸/۹۵ در بهار مشاهده گردید.

جدول شماره ۱۱: میانگین برخی پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب مزرعه شماره ۹

pH	Temperature(°C)	DO(mg/l)	TDS(g/l)	NH ₄ ⁺ (mg/l)	Nitrate(mg/l)	Nitrite(mg/l)	فصل
8.70±0.19	10.83±1.48	9.47±0.47	0.207±0.017	0.080±0.014	0.780±0.097	0.006±0.002	بهار
8.49±0.19	14.17±1.27	8.51±0.30	0.207±0.013	0.065±0.022	1.285±0.821	0.017±0.018	تابستان
8.48±0.19	9.60±2.95	9.64±0.69	0.220±0.017	0.226±0.129	0.542±0.209	0.000±0.000	پائیز
8.49±0.17	7.43±1.05	9.53±0.20	0.267±0.068	0.480±0.382	1.099±0.375	0.044±0.044	زمستان
8.54±0.20	10.51±3.05	9.29±0.64	0.225±0.044	0.213±0.261	0.927±0.542	0.017±0.029	میانگین کل سال

در مزرعه شماره ۹، دامنه میانگین میزان نیتريت، حد اقل ۰/۰ و در فصل پائيز و حد اکثر ۰/۰۴۴ ميلي گرم در ليتر در فصل زمستان، نيترات حد اقل ۰/۵۴۲ در فصل پائيز و حد اکثر ۱/۲۸۵ ميلي گرم در تابستان، يون آمونيم، حد اقل ۰/۰۶۵ در فصل تابستان و حد اکثر ۰/۴۸۰ ميلي گرم در فصل زمستان، مواد جامد محلول، حداقل ۰/۲۰۷ در فصول بهار و تابستان، حد اکثر ۰/۲۶۷ ميلي گرم در فصل زمستان، اكسيژن، حد اقل ۸/۵۱ در فصل تابستان، حد اكثر ۹/۶۴ ميلي گرم در ليتر در فصل پائيز، درجه حرارت، حد اقل ۷/۴۳ درجه سانتی گراد در زمستان و حد اكثر ۱۴/۱۷ درجه سانتی گراد در فصل تابستان و پ هاش، حد اقل ۸/۴۸ در پائيز و حد اكثر ۸/۷۰ در بهار مشاهده گرديد.

جدول شماره ۱۲: میانگین برخی پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب مزرعه شماره ۱۰

pH	Temp.(°C)	DO(mg/l)	TDS(g/l)	NH ₄ ⁺ (mg/l)	Nitrate (mg/l)	Nitrite (mg/l)	فصل
8.75±0.20	11.20±1.98	9.35±0.35	0.240±0.014	0.087±0.023	1.038±0.096	0.007±0.001	بهار
8.66±0.04	14.27±0.97	8.41±0.30	0.217±0.019	0.071±0.048	0.721±0.863	0.021±0.021	تابستان
8.68±0.17	8.57±2.35	10.07±0.45	0.227±0.027	0.227±0.147	1.049±0.155	0.002±0.001	پائیز
7.87±0.98	7.00±1.58	10.05±0.96	0.263±0.043	0.103±0.072	0.916±0.187	0.049±0.030	زمستان
8.49±0.62	10.26±3.29	9.47±0.89	0.237±0.033	0.122±0.105	1.038±0.466	0.020±0.026	میانگین کل سال

در مزرعه شماره ۱۰، دامنه میانگین میزان نیتريت، حد اقل ۰/۰۰۲ در فصل پائيز و حد اکثر ۰/۰۴۹ ميلي گرم در ليتر در فصل زمستان، نترات حد اقل ۰/۷۲۱ در فصل تابستان و حد اکثر ۱/۰۴۹ ميلي گرم در پائيز، يون آمونيوم، حداقل ۰/۰۷۱ در فصل تابستان و حد اکثر ۰/۲۲۷ ميلي گرم در فصل پائيز، مواد جامد محلول، حداقل ۰/۲۱۷ در فصل تابستان، حد اکثر ۰/۲۶۳ ميلي گرم در فصل زمستان، اكسيژن، حد اقل ۸/۴۱ در فصل تابستان، حد اكثر ۱۰/۰۷ ميلي گرم در ليتر در فصل پائيز، درجه حرارت، حد اقل ۷ درجه سانتی گراد در زمستان و حد اكثر ۱۴/۲۷ درجه سانتی گراد در فصل تابستان و پ هاش، حد اقل ۷/۸۷ در زمستان و حد اكثر ۸/۷۵ در بهار مشاهده گرديد.

جدول ۱۳: میانگین سالانه میزان برخی پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب مزارع تکثیر و پرورش ماهیان سردآبی منتخب منطقه هراز استان مازندران

مزارع	Nitrite (mg/l)	Nitrate (mg/l)	NH ₄ ⁺ (mg/l)	TDS(g/l)	DO(mg/l)	Temp. (°C)	pH
۱	0.007±0.009	0.681±0.250	0.118±0.214	0.193±0.050	9.026±0.76	10.63±2.36	8.30±0.30
۲	0.008±0.008	0.717±0.286	0.056±0.037	0.202±0.050	8.92±0.56	10.85±1.93	8.43±0.20
۳	0.011±0.022	0.834±0.355	0.094±0.065	0.215±0.064	9.32±0.51	11.08±2.71	8.42±0.10
۴	0.011±0.020	0.798±0.196	0.109±0.097	0.213±0.048	9.47±0.60	10.22±3.08	8.19±0.62
۵	0.011±0.011	0.782±0.343	0.113±0.087	0.221±0.034	9.24±0.54	10.94±2.84	8.33±0.45
۶	0.011±0.014	0.724±0.251	0.083±0.044	0.208±0.032	9.30±0.55	10.38±3.24	8.37±0.47
۷	0.020±0.027	0.825±0.385	0.128±0.104	0.207±0.029	9.34±0.62	10.53±3.16	8.30±0.34
۸	0.016±0.020	0.802±0.284	0.091±0.051	0.222±0.038	9.33±0.74	10.63±3.24	8.54±0.61
۹	0.017±0.029	0.927±0.542	0.213±0.261	0.225±0.044	9.29±0.64	10.51±3.05	8.54±0.20
۱۰	0.020±0.026	1.038±0.466	0.122±0.105	0.237±0.033	9.47±0.89	10.26±3.29	8.49±0.62

۳-۴- تعداد کلی باکتری های داخل آب

جدول ۱۴: میانگین تعداد کلی باکتریهای هوازی در آب ورودی مزارع منتخب مورد بررسی

فصل مزرعه	بهار	تابستان	پاییز	زمستان
F1	1753±1097	26607±31378	10590±13966	720±14
F2	6680±5098	28100±31301	60473±85963	433±267
F3	1880±1698	25200±28237	6500±3668	5667±2853
F4	797±262	19993±23173	5887±3905	897±75
F5	2900±1744	33500±40730	50600±57602	3033±671
F6	7320±9130	20633±24872	36783±41018	1500±220
F7	900±381	15500±15160	70307±100467	1037±261
F8	7167±9230	39533±50736	46433±60158	1040±619
F9	8810±10944	33533±42804	53763±76405	1500±220
F10	1157±396	23600±27029	36700±45615	2600±724

میانگین تعداد باکتریهای هوازی به ترتیب از فصل زمستان، بهار، تابستان و پاییز افزایش می یابد به طوریکه در فصل زمستان حد اقل 0.7×10^2 و حد اکثر 5×10^3 ، فصل بهار حد اقل 0.7×10^2 و حد اکثر 8×10^3 ، فصل تابستان حد اقل 15×10^3 و حد اکثر 39×10^3 و فصل پاییز حد اقل 0.6×10^4 و حد اکثر 7×10^4 شمارش گردید.

در بررسی آماری نتایج جهت بررسی تاثیر گذاری برخی از متغیرهای کمی از جمله نیتريت، نترات، آمونیوم، کدورت، اکسیژن محلول، دبی آب، شمارش کلی باکتریهای هوازی آب بر بروز یا عدم بروز استرپتوکوکوزیس از مدل رگرسیون لجستیک استفاده گردید.

براساس نتایج بدست آمده و با استناد به اینکه عدد صفر (۰) برای وقوع بیماری و عدد یک (۱) برای عدم وقوع بیماری استرپتوکوک همراه بامدل Wald ; Backward در نظر گرفته شده بود، چنین به نظر میرسد که متغیرهای مستقل تعریف شده بر متغیر وابسته تاثیر داشته و آزمون مربوطه نشان دهنده برازش مناسبی از مدل است () :

(chi - square: 58.17 sig.:0.000) از آنجایی که Nagelkerke R - square

در مرحله هفتم برابر با ۰/۲ تعیین گردیده است، محتمل است تبیین تغییرات متغیر وابسته از روی متغیرهای مستقل در رگرسیون لجستیک ۲۰٪ گردد. به عبارتی تنها ۲۰٪ این تغییرات توسط مدل قابل بررسی است و

احتمالا عوامل دیگری نیز دخیل هستند که میتوانند این درصد را افزایش دهند. حساسیت مدل در تفسیر تغییرات به صورت کلی ۹۷٪ است.

در خاتمه و با توجه به ضرایب بدست آمده معادله مدل لوجیت به شرح زیر است:

$$\ln\left(\frac{P}{1-P}\right) = 33/96 - 0/6\text{month} + 22/76\text{nitrite} - 1/67\text{DO} + 0/96\text{Temperature}$$

۵- بحث

استرپتوکوکوزیس از بیماریهای مهم باکتریایی است، هر چند که در لیست بیماریهای مهم اختار کردنی سازمان OIE نیست (Eldar and Ghittina, 1999) ولی از چالش های بهداشتی و بیماریهای مهم صنعت آبی پروری ماهیان سردآبی در سالهای اخیر بوده است بطوریکه در برخی مواقع سال (فصول گرم) موجب بروز تلفات در اغلب مراکز پرورش ماهیان سردآبی استانهای صاحب این صنعت (گیلان، مازندران، لرستان، فارس و بوی احمد و کهکولیه و تهران) گردیده است (اخلاقی و کشاورز، ۱۳۸۱؛ سلطانی و همکاران، ۱۳۸۶؛ سلطانی و همکاران، ۱۳۸۷ و Soltani et al., 2008 و pourgholam et al, 2011 همچنین این بیماری به شکل همه گیر در ماهیان آب شیرین و دریایی در اکثر نقاط دنیا و از کشورهای مختلف شامل آفریقای جنوبی، استرالیا، سنگاپور، انگلیس، نروژ، چین، ترکیه، اسپانیا، ایتالیا و کره گزارش شده است (Bromage & Owens 2002). این بیماری به عنوان بیماری ورشکستگی نامگذاری شده زیرا در فرم حاد می تواند تا ۷۰ درصد تلفات را در ماهیان مبتلا موجب گردد (۱۳۸۱ نامداری، سعیدی و همکاران ۱۳۸۹ Bromage et al 1999، Inlgis et al. 1993، Yanong، Shoemaker, et al., 2006; Garcia, et al., 2008; Romalde, et al., 2008, & Floyd, 2002). طی این تحقیق مشخص شد که ۸ عدد از ۱۷۵ عدد بچه ماهی دارای علائم بیماری (۴/۶ درصد) و ۲ عدد از ۳۰۷ عدد بچه ماهی فاقد علائم بیماری (۰/۷ درصد) آلوده به باکتری استرپتوکوک بودند و از طرفی ۲۱ عدد از ۲۳۵ عدد ماهی (۸/۹ درصد) پرواری دارای علائم بیماری و ۵ عدد از ۴۸۳ عدد ماهی پرواری فاقد علائم بیماری (۱ درصد) به باکتری استرپتوکوک آلوده بودند. در مجموع از ۴۱۰ عدد ماهی بیمار (همراه با علائم) فقط در ۲۸ عدد (۷ درصد) ماهیان استرپتوکوکوزیس مشاهده گردید. نتایج این مطالعه با نتایج پورغلام (سالهای ۸۷ و ۸۸) در استان مازندران که از ۷۲ عدد ماهی واجد علائم بالینی تنها از ۵ عدد (۷ درصد) باکتری استرپتوکوک جدا کرد کاملاً مشابهت دارد. اما این نتیجه با نتایج نامداری (۱۳۸۱) در استان فارس که از ۲۴۰ نمونه ماهی واجد علائم بالینی تنها از ۲۸ عدد ماهی (۱۳ درصد) باکتری استرپتوکوک جدا کرد نمونه یک اختلاف ۵ درصدی مشاهده می شود. در مطالعه ای دو ساله بر روی عوامل رایج استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس در استان فارس از ۴ مزرعه ۶۰۰ عدد ماهی واجد علائم بالینی نمونه برداری و از کلیه، مغز و کبد آنها کشت تهیه گردید. در مجموع ۴۸۰ پرگنه مثبت به استرپتوکوکوزیس بدست آمد (۸۰ درصد) که از این تعداد ۳۹۰ نمونه *S. iniae* (۸۲ درصد) و ۹۰ نمونه *L. garvieae* (۱۸ درصد) شناسایی شدند و از طرفی کشت باکتریایی ۲۰ درصد ماهیان واجد علائم منفی بود (Soltani & Tarahomi ۲۰۰۹). در بررسی تعداد دیگری در استان اصفهان ۷۲ عدد ماهی با وزن ۲۰۰ - ۱۵۰ گرم واجد علائم بالینی از ۶ مزرعه پرورش قزل آلا رنگین کمان نمونه برداری و در آزمایشگاه از بافت های ۱۰۰ درصد کلیه و کبد آنها کشت میکروبی انجام دادند. باکتری استرپتوکوکوس جدا سازی شد (Moghadas و Mohammadi Arani ۲۰۰۹) به نظر می رسد این نزدیکی درصد حضور بیماری استرپتوکوکوزیس در استان مازندران (منطقه هراز) در سالهای ۸۷، ۸۸ با سالهای ۹۰ و ۹۱ با اختلاف یک

زمان دو ساله به دلایلی مثل درجه حرارت آب، برخی فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب، عدم تغییر و هر گونه اصلاح در کیفیت آب مورد استفاده رودخانه هراز، عدم استفاده از عوامل پیشگیرانه (محرک های ایمنی غیر اختصاصی و اختصاصی، اصلاح جیره غذایی، عدم اصلاح مدیریت جابجای تخم، لارو، بچه ماهی و ماهی پروراری) و مدیریت پرورش در بروز بیماری استرپتوکوکوزیس باشد و اختلاف در صد کمتر حضور بیماری استرپتوکوکوزیس در منطقه هراز با مزارع استان های فارس و اصفهان به نظر می رسد مربوط به درجه حرارت آب مورد استفاده باشد. از آنجایی که در منطقه هراز از آب رودخانه ای با رژیم برفی یخچالی استفاده میگردد دمای آب کمتر از آب مصرفی در استان فارس و اصفهان است که معمولاً از آب چشمه استفاده می گردد که حد اقل چند درجه سانتی گراد با آب رودخانه هراز اختلاف دارد. از عوامل اصلی دیگر اختلاف میتوان به کاهش دبی آب چشمه های مورد استفاده در فصول گرم سال و به دنبال آن کاهش میزان اکسیژن محلول در آب، تغییرات کیفی آب اشاره کرد (نامداری ۱۳۸۱). از نتایج دیگر این بررسی جداسازی یک باکتری باسیلی شکل گرم منفی از ۴۳/۸ درصد ماهیان واجد علایم بالینی (اعم از بچه ماهی و ماهی پروراری) بود که در شناسایی های بعدی دو جنس یرسینیا و ویبریو جداسازی گردید. نتیجه اینکه در مجموع از ۵۰/۸ درصد ماهیان بیمار دارای علائم و نشانه های بالینی عوامل باکتریایی جدا سازی شد در حالیکه از ۴۹/۲ درصد ماهیان بیمار با علایم بالینی مشابه، کشت باکتریایی آنها منفی بود. در مجموع بررسیهای کمی انجام شده از کل ۵۰/۸ درصد ماهیان واجد علایم بالینی که کشت باکتریایی آنها مثبت بود تنها ۷ درصد آنها مبتلا به استرپتوکوکوزیس بودند. لذا بر خلاف تصور گذشته این بیماری دیگر یک بیماری تهدید کننده مهم در صنعت آبی پروری ماهیان سردآبی نمی باشد و با توجه به نتایج بدست آمده به نظر می رسد که بیشتر باید به مشکلات ایجاد شده ناشی از سایر عوامل مانند یرسینیا توجه گردد. نکته دیگری که باید به آن اشاره کرد عدم جداسازی هر گونه باکتری بیماریزا از ۴۹/۲ درصد بچه ماهیان و ماهیان پروراری دارای علائم بالینی بود و این امر باید بیشتر مورد توجه سازمانهای متولی بهداشت این صنعت قرار گیرد. زیرا در نگاه اول با مشاهده علائم بالینی در ماهیان، ممکن است به اشتباه ما را بسوی تشخیص به یک بیماری عفونی باکتریایی هدایت کند که نتیجه آن تجویز آنتی بیوتیک است که این کار نه تنها بیماری را کنترل نمی کند بلکه موجب افزایش مقاومت دارویی باکتریهای محیطی شده و نیز ضرر اقتصادی بیشتری به پرورش دهنده وارد می نماید. همچنین استفاده بی رویه از آنتی بیوتیکها و در پی آن باقی ماندگی دارویی در گوشت ماهی، بهداشت انسانی را نیز تهدید می کند. بنابر این با توجه به نتایج بدست آمده ضروری است با مشاهده علایم بالینی حتما اقدام به انجام آزمایشات باکتری شناسی شده و نیز سایر عوامل مثل کیفیت جیره مصرفی و یا فاکتورهای محیطی مورد بررسی قرار گیرد.

بیشترین درصد آلودگی ماهیان پروراری واجد علائم بالینی به باکتری استرپتوکوک به ترتیب ۳۵، ۱۹، ۱۲/۱، ۱۱/۵، ۱۰، ۵/۹ و ۳ درصد به ترتیب و در مزارع ۳، ۱۰، ۵، ۸، ۲، ۹، ۴ مشاهده گردید و در ۳ مزرعه (مزارع ۱، ۶ و ۷) دیگر، دیده نشد (جدول شماره ۱). از طرف دیگر در بچه ماهیان واجد علائم بالینی به

باکتری استرپتوکوک به ترتیب ۱۵/۴، ۱۱/۱، ۴/۳ و ۴ درصد و در مزارع ۶، ۱، ۷ و ۳ مشاهده گردید (جدول شماره ۱). تحلیل بدست آمده از این نتایج نشان می دهد:

۱- استرپتوکوکوزیس در منطقه هراز در تمام مزارع منتخب مورد بررسی مشاهده گردیده و علی رغم اینکه بروز آن گسترده است در شرایط فعلی یک بیماری تهدید کننده محسوب نمی گردد.

۲- ماهیان قزل آلا ی پرواری در مقایسه با بچه ماهیان حساسیت بیشتری نسبت به بیماری داشتند.

۳- دو مزرعه شماره ۱ و ۲ که به شکل مستقل از رودخانه هراز آب می گیرند و با آب خروجی مزارع دیگر ارتباط ندارند، از بیماری ایمن نیستند. و بعبارت دیگر منابع آلودگی غیر از آب ورودی مزارع از جمله انتقال ماهیان آلوده، منابع آلوده دامی و... میتواند در ایجاد آلودگی و بروز بیماری موثر باشند.

۴- منبع آب مشترک و عدم اصلاح آب خروجی مزارع و ورود مستقیم آن به رودخانه یک عامل اصلی در انتشار و گسترش آلودگی استرپتوکوکوزیس است

در این راستا این سؤال مطرح می گردد که چرا بیماری در تمام مزارع این منطقه مشاهده شد، هرچند که درصد تلفات ماهیان واجد علائم این بیماری در مقایسه با مناطقی مثل استان های چهارمحال و بختیاری، لرستان، فارس و کهگیلویه و بویراحمد بسیار کمتر است. نتیجه دیگر آنکه در ماهیان پرواری به ظاهر سالم بیشترین درصد آلودگی به ترتیب ۸/۳، ۲/۲ و ۱/۵ درصد در مزارع ۵، ۳ و ۹ بود در حالیکه باکتری از این گروه از ماهیان در سایر مزارع جداسازی نشد. همچنین این باکتری از ۳/۲ و ۲/۸ درصد بچه ماهیان به ظاهر سالم در مزارع ۵ و ۸ جداسازی گردید در حالیکه کشت سایر بچه ماهیان سالم از سایر مزارع منفی بود (جدول شماره ۱).

براین اساس به نظر می رسد که ماهیان پرواری و بچه ماهیان به ظاهر سالم که فاقد هر گونه علائم بالینی هستند به عنوان ناقل عمل کرده مهمترین نقش در انتقال بیماری از یک مزرعه به مزرعه دیگر را بازی می کنند و متأسفانه این نقل و انتقال ها بدون انجام هرگونه تمهیدات بهداشتی در منطقه هراز به کرات اتفاق می افتد.

در ماهیان واجد علائم بالینی طیف متنوعی از علائم غیر طبیعی مشاهده گردید که شامل:

شنای نامنظم (چرخشی یا مارپیچی)، از دست دادن تعادل، بیحالی، تیرگی پوست، بیرون زدگی یک یا دو طرفه چشم، کدورت قرنیه، خون ریزی در اطراف چشم، صفحه آبششی، قاعده باله های شکمی و مخرجی، اتساع محوطه بطنی، زخم در پوست، خونریزی در دهان، خونریزی در عضلات، کیسه شنا، پرخونی کلیه و طحال، رنگ پریدگی و بزرگ شدن کبد، آب آوردگی شکم و در مواردی بروز خونریزی در سطح روده، کبد و قلب مشاهده شد. لیکن نمی توان به صراحت گفت که علائم اختصاصی استرپتوکوکوزیس کدام بوده است زیرا در این بررسی به غیر از باکتری استرپتوکوک، باسیل های گرم منفی (یرسینیا) از بافت کلیه جدا سازی شد. همچنین باید در نظر داشت که ۴۸/۲ درصد ماهیان واجد علائم از نظر کشت باکتری منفی بودند، که باید علل ایجاد کننده این علائم را در مدیریت تغذیه و آب جستجو کرد. هرچند علائم بالینی مشاهده شده در بسیار از مطالعات دیگر نیز آمده است (Yanong & Floyed ۲۰۰۲؛ Salvador و همکاران، ۲۰۰۵؛ Eldar et al., ۱۹۹۷؛

Soltani et al., ۱۹۹۹؛ Bromage et al., ۲۰۰۲؛ Pourgholam et al., ۲۰۱۰؛ Saeedi et al., ۲۰۰۹؛ Zamri-saad و Amal؛ ۲۰۱۱. اخلاقی و کشاورزی، ۱۳۸۱؛ سلطانی و همکاران، ۱۳۸۶؛ سلطانی و همکاران، ۱۳۸۷؛ نامداری، ۱۳۸۱) لیکن نمی توان صرفاً بر اساس علایم بالینی به تشخیص قطعی استرپتوکوکوزیس رسید.

در این مطالعه از ۴۱۰ عدد ماهی پرواری و بچه ماهی بیمار (واجد علائم بالینی) مورد بررسی ۲۹ مورد (۷/۲ درصد) و از ۷۱۰ عدد ماهی پرواری و بچه ماهی سالم (فاقد علائم بالینی) ۷ مورد (۱ درصد) به باکتری استرپتوکوک آلوده بودند. باکتری استرپتوکوک جدا سازی شده بر اساس آزمون های یبوشیمیایی و آزمایشات مولکولی استرپتوکوکوس یوبریس (*Streptococcus Uberis*) شناسایی گردید. باکتری *S. uberis* از عوامل مهم ورم پستان تحت درمانگاهی در گاوهای شیری است که باعث کاهش شیر می گردد و متأسفانه اطلاعات کمی از بیماریزایی و اپیدمیولوژی این باکتری در دسترس است (Coffy و همکاران ۲۰۰۶). در مطالعه پورغلام و همکاران در سال ۲۰۱۰ از ۷۲ ماهی بیمار واجد علائم در استان مازندران (منطقه هراز) ۵ مورد مثبت (۷ درصد) به باکتری استرپتوکوک و از نوع استرپتوکوکوس فسیوم (*Streptococcus facieum*) را گزارش کردند. نامبرده استرپتوکوکوس یوبریس را با درصد فراوانی ۳۸/۹٪ به عنوان رایج ترین عامل استرپتوکوکوزیس در استانهای چهار محال بختیاری، گیلان، کهگیلویه و بویراحمد، کرمانشاه و فارس گزارش کرده است و از طرفی در سال ۱۳۷۹ قیاسی و همکاران نیز از مولدین ماهی قزل آلا ی رنگین کمان باکتری استرپتوکوکوس فسیوم (*Streptococcus facieum*) را در منطقه هراز گزارش کرد که نتایج هر دوی این مطالعه با مشاهدات ما ۱۰۰ درصد اختلاف دارد، استرپتوکوکوس یوبریس که در دیگر استانها رایج ترین نوع آلودگی ماهیان سردابی به بیماریهای باکتریایی استرپتوکوکی است، اما چرا این باکتری در مزارع ماهیان سردابی استان مازندران (منطقه هراز) مشاهده شده است؟ به نظر می رسد نقل و انتقال تخم های چشم زده، لارو، بچه ماهی، ماهیان پرواری، غذا، وسایل حمل و نقل و حتی در مواردی نقل و انتقال مولدین و نیز عدم توجه به قرنطینه، مهمترین عامل نقل و انتقال این آلودگی باشد. در خصوص بیماریزایی این باکتری در ماهیان اطلاعات بسیار اندکی وجود دارد.

در بررسی آماری نتایج بدست آمده جهت بررسی تاثیرگذاری برخی از متغیرهای کمی از جمله نیتريت، نترات، آمونیوم، کدورت، اکسیژن محلول، دبی آب، شمارش کلی باکتریهای هوازی آب بر بروز یا عدم بروز استرپتوکوکوزیس از مدل رگرسیون لجستیک استفاده گردید. براساس نتایج بدست آمده و با استناد به اینکه عدد صفر (۰) برای وقوع بیماری و عدد یک (۱) برای عدم وقوع بیماری استرپتوکوک همراه بامدل Backward ; Wald در نظر گرفته شده بود، چنین به نظر میرسد که متغیرهای مستقل تعریف شده بر متغیر وابسته تاثیر داشته و آزمون مربوطه نشان دهنده برازش مناسبی از مدل است ($\chi^2 = 58.17$; sig.: 0.000). از آنجایی که R – square Nagelkerke در مرحله هفتم برابر با ۰.۲ تعیین گردیده است، محتمل است تبیین تغییرات متغیر وابسته از روی

متغیرهای مستقل در رگرسیون لجستیک ۲۰٪ گردد. به عبارتی تنها ۲۰٪ این تغییرات توسط مدل قابل بررسی است و احتمالا عوامل دیگر یا دیگری نیز دخیل هستند که میتوانند این درصد را افزایش دهند. حساسیت مدل در تفسیر تغییرات به صورت کلی ۹۷٪ است.

در خاتمه و با توجه به ضرایب بدست آمده معادله مدل لوجیت به شرح زیر است:

$$\ln\left\{\frac{P}{1-P}\right\} = 33/96 - 0/6 \text{ month} + 22/76 \text{ nitrite} - 1/67 \text{ DO} + 0/96 \text{ Temperature}$$

با توجه به نتایج قوق تاثیر گذاری نیتريت بسیار بالا بوده و تقریبا با یک واحد (ppm) میلی گرم در لیتر تغییر، ۲۲ برابر در احتمال وقوع بیماری تغییر ایجاد مینماید. در صورتی که به ازای هر یک درجه سانتی گراد افزایش دما، یک درجه به بروز بیماری و به ازای هر ۱/۵ واحد کاهش اکسیژن محلول در آب، یک درجه میزان بروز بیماری تغییر می نماید (افزایش مییابد).

لذا به طور کلی به نظر میرسد در بروز استرپتوکوکوزیس عوامل مدیریتی و بهداشتی در سطح مزرعه از اهمیت ویژه ای برخوردار بوده و ارزیابی آنان بسیار مهم است.

بطور کلی نتایج بدست آمده مؤید این مطلب است که عواملی از جمله میزان نیتريت، درجه حرارت و اکسیژن محلول در آب و نیز ماههای سال (فصول) که باز بیشتر به درجه حرارت مرتبط می شود به میزان ۲۰٪ بروز استرپتوکوکوزیس را تحت تاثیر قرار می دهند

یکی از عوامل مهم و تاثیر گذار در بروز بیماریهای باکتریایی ماهی وجود استرس است که میتواند ناشی از شرایط محیطی باشد که از جمله می توان به درجه حرارت آب که متاثر از درجه حرارت هوا است اشاره کرد. میانگین درجه حرارت آب مزارع منتخب (جدول ۱۷) که در چهار فصل مورد بررسی قرار گرفت به غیر از یک مورد (مزرعه ۸) که در تابستان ۱۵.۳ درجه سانتی گراد ثبت گردید در بقیه مزارع بین ۵/۷۸ تا ۱۴/۶ درجه سانتی گراد متغیر بود، بنابراین درجه حرارت یکی از عوامل محدود کننده استرپتوکوکوزیس در منطقه هراز بود و درصد آلودگی ماهیان بیمار گواه بر این ادعا است و بر اساس مدل لوجیت به ازای افزایش یک درجه سانتی گراد یک درجه بروز بیماری بیشتر می شود لذا درجه حرارت پایین آب مورد استفاده در منطقه هراز می تواند یکی از عوامل محدود کننده اصلی بیماری مورد نظر باشد. مطالعات دیگر محققین نشان داده است که درجه حرارت بیش از ۱۵ درجه سانتیگراد می تواند با افزایش تکثیر و قدرت بیماری زایی باکتری در انتشار و گسترش بیماری مورد نظر نقش داشته باشد (Eldar و Ghittino ۱۹۹۹). Inglis et al در مطالعات خود در سال ۱۹۹۳ نشان داد که بین استرس های محیطی به ویژه درجه حرارت آب و فصل که به درجه حرارت آب نیز مرتبط است و بروز استرپتوکوکوزیس ارتباط معنی دار وجود دارد بطوریکه باعث تلفات ۵۰ درصدی در ماهی می گردد. Sepahi و همکاران در سال ۲۰۱۳ در بررسی اثر درجه حرارت آب بر میزان بازماندگی ماهی قزل آلا در مواجهه با دز های مختلف باکتری استرپتوکوکوس آگالاکتیه در دمای ۱۸ درجه سانتی گراد نشان داد که پس از ۲-۳ روز علائم بالینی ظاهر شده و میزان بازماندگی با افزایش دز راتا ۱۳ درصد گزارش کردند و حال

آنکه در دمای ۱۲ درجه سانتی گراد میزان بازماندگی در مقایسه با دمای ۱۸ درجه سانتی گراد دارای اختلاف معنی دار بود و بین ۲ تا ۳ برابر در شرایط یکسان (دز مساوی) میزان ماندگاری ماهی در درجه حرارت ۱۲ درجه سانتی گراد بیشتر است. Hamid و همکاران در سال ۲۰۱۰ گزارش کردند که بین بروز شیوع این بیماری با درجه حرارت آب (۱۸ درجه سانتی گراد) رابطه معنی دار وجود دارد. درجه حرارت آب نه تنها در ماهیان سردابی موجب افزایش حساسیت به عفونت استرپتوکوکی میگردد، بلکه در ماهیان گرمابی نظیر تیلپیا نیز افزایش درجه حرارت و در حرارت بیش از ۳۰ درجه سانتیگراد بروز بیماری و تلفات ناشی از آن بسیار بیشتر از حرارت زیر ۳۰ درجه سانتیگراد است (Rodkhum و همکاران ۲۰۱۱ و Clem و Blv ۱۹۹۲).

یکی دیگر از عوامل مستعد کننده این بیماری که با حرارت نیز در ارتباط است، اکسیژن محلول در آب است که با افزایش و کاهش آن رابطه مستقیم دارد. در تمامی فصول مورد بررسی و در تمامی مزارع منتخب، میزان اکسیژن محلول در آب بین ۸.۵ میلی گرم در لیتر در تابستان و ۱۰.۲ میلی گرم در لیتر متغیر بود و این میزان اکسیژن محلول در آب با معیارهای زیست محیطی ماهی قزل آلا برای پرورش منطبق و بسیار مطلوب می باشد (لاوسون ۱۳۸۰). مطلوب بودن میزان اکسیژن محلول در آب محیط پرورش در منطقه هراز و با استناد به دبی آب مورد استفاده و درجه حرارت کمتر از ۱۵ درجه سانتیگراد آب می تواند از عوامل محدود کننده استرپتوکوکوزیس در این منطقه باشد، اما بر اساس نتایج آماری به ازای هر ۱.۵ واحد کاهش اکسیژن محلول در آب یک درجه در میزان بروز بیماری تغییر ایجاد شده، یعنی افزایش می یابد. با توجه به ضرایب بدست آمده در معادله مدل لجیت تاثیر گذاری میزان نیتريت آب بسیار بالا بوده و تقریباً با یک واحد (ppm) میلی گرم در لیتر تغییر، ۲۲ برابر در احتمال وقوع این بیماری تغییر ایجاد مینماید و این نتیجه بدست می آید که میزان نیتريت در مقایسه با دیگر پارامترهای تاثیر گذار مثل درجه حرارت آب، میزان اکسیژن محلول در آب و ماهها از تاثیر گذار ترین عامل است که با کنترل این پارامتر می توان با شرایط حاکم بر این منطقه تا ۲۰ درصد از بروز بیماری پیشگیری نمود. میزان نیتريت آب ۱۰ مزرعه منتخب مورد بررسی ۱۰ تا ۱۰۰ برابر کمتر از محدوده حد مجاز با معیارهای زیست محیطی ماهی قزل آلا برای پرورش تعیین گردید (جدول ۱۷). هر چند که میزان آن برای باکتری استرپتوکوک معلوم نیست اما بالا بودن میزان اکسیژن محلول در آب و پایین بودن درجه حرارت آب در کنترل میزان ترکیبات نیتروژنی از جمله میزان نیتريت موثر است. Inglis et al در مطالعات خود در سال ۱۹۹۳ نشان داد که بین استرس های محیطی به ویژه کیفیت بد آب از نظر میزان نیتريت و آمونیاک رابطه معنی دار وجود دارد. در بررسی های آماری تبیین تغییرات متغیر وابسته (بیماری) از روی متغیرهای مستقل (برخی پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب) در رگرسیون لجستیک ۲۰٪ تعیین گردید. به عبارتی تنها ۲۰٪ این تغییرات توسط مدل قابل بررسی است و احتمالاً عوامل دیگر یا دیگری نیز دخیل هستند که میتوانند این درصد را افزایش دهند، لذا به طور کلی به نظر میرسد در بروز استرپتوکوکوزیس عوامل مدیریتی و بهداشتی (رقم بندی و یا سورتینگ، آمونیاک غیر یونیزه، تراکم، میزان رسوب کف استخر، سرعت آب داخل استخر، کیفیت غذای

مصرفی ، تعداد باکتری استرپتوکوک در واحد حجم آب ، جابجایی بچه ماهی ، نگهداری ماهی در دو اقلیم متفاوت مثلا دشت و کوهستان با درجه حرارت و کیفیت آب متفاوت ، استفاده از ابزار مشترک در جابجایی ، وسایل حمل و نقل ، نوعی بچه ماهی و تفاوت در نوع جمعیت ماهی پرورشی و اندازه ماهی ، نظافت استخر ، عدم قرنطینه بچه ماهی و ... خریداری شده در زمان رها سازی) در سطح مزرعه از اهمیت ویژه ای برخوردار بوده که در مطالعه ما با توجه به حجم کار و تغییر وضعیت موجود و عدم ثبات پارامترهای مذکور در طول زمان بررسی مد نظر قرار نگرفت به رغم اینکه از نظر ارزیابی بسیار مهم بوده است. نتیجه آنکه استرپتوکوکوزیس در حال حاضر در منطقه شرق استان مازندران بر خلاف تصور یک بیماری غالب نبوده و چالش های دیگری مثلا بیماری دهان قرمز و بیماریهای غیر عفونی پیش روی صنعت آبی پروری ماهیان سردابی است.

پیشنهادهای

- ۱- با توجه به اهمیت بیماری و درصد تلفات ناشی از آن در شرایطی با درجه حرارت بیش از ۱۵ درجه سانتی گراد آب ، در مزارعی راکه از آب چاه و چشمه در شرایط دشت و نه کوهستان استفاده می کنند مورد بررسی قرار گیرد ، تا بر این اساس ، جابجایی ها با انجام و اعمال مدیریت بهداشتی انجام گیرد
- ۲ درصد تلفات با نوع استرپتوکوک مشاهده شده در دیگر استانهای شیلاتی مثل چهار محال ، یاسوج ، فارس ، کرمانشاه ، لرستان و آذربایجان بررسی گردد ، تا براساس اهمیت نوع استرپتوکوک هرگونه برنامه ریزی های کنترلی انجام شود
- ۳ اجرای برنامه های مدیریت های پرورش ، مدیریت بهداشتی به ویژه اجرای قرنطینه در اولویت کنترل این بیماری قرار گیرد
- ۴- با توجه به گونه استرپتوکوک مشاهده شده در استان مازندران استفاده از واکسن استرپتوکوک که از دو باکتری استرپتوکوکوس اینی و لاکتوکوکوس گارونی تهیه شده است ، توصیه نمی گردد ، چونکه برای پرورش دهنده اقتصادی نخواهد بود ، ضمن آنکه ابهام های دیگری در پیش رو دارد
- ۵- به نظر استفاده از پروبیوتیک ها و دیگر محرک های ایمنی برای کنترل بیماری و جلوگیری از خسارتهای احتمالی زیاد ناشی از آن باید موثر تر باشد
- ۱- برای کنترل مشکلات این صنعت در منطقه هراز ، اجرای مدیریت واحد و متمرکز بر این صنعت یکی از موثرترین ابزار مدیریتی می باشد که انجام آن از طریق سازمانهای اجرایی امکان پذیر است .
- ۲- با شرایطی را که بر صنعت آبرزی پروری منطقه هراز از نظر مدیریت استفاده از آب ، غذا ، پرورش و بهداشت حاکم است ، حل هر گونه مشکل پیش آمده غیر ممکن بنظر می رسد
- ۳- به صرف مشاهده علائم بالینی در ماهی ، استفاده از آنتی بیوتیک حد اقل تا ۵۰ درصد ، نه تنها استفاده ای نخواهد داشت بلکه ضرر نیز دارد
- ۴- برگزاری انتقال یافته های این بررسی برای کاربران اصلی (پرورش دهندگان هراز ، کارشناسان شیلات استان مازندران)

منابع

- ۱- آذری تاکامی، ق.، ۱۳۶۳. اصول تکثیر و پرورش ماهی، انتشارات روابط عمومی وزارت جهاد کشاورزی، ۱۵۲ صفحه - صفحه ۳۸.
- ۲- آذری تاکامی، ق. ۱۳۸۵. مدیریت بهداشتی و روشهای پیشگیری و درمان بیماریهای ماهی. انتشارات پریور. ویرایش دوم با ضمیمه بیماری استرپتوکوکوس. ۳۱۲ صفحه
- ۳- اخلاقی. مصطفی، محمد کشاورزی، ۱۳۸۱، وقوع استرپتوکوکوزیس در مزارع پرورش قزل آلا استان فارس، مجله تحقیقات دامپزشکی ایران، دانشگاه شیراز، دوره سوم، شماره دوم، ۱۹۰ - ۱۸۳
- ۴- اینگلیس، ر.ج. روبرت، ن.ر. و برومیج.؟. بیماریهای باکتریایی ماهی. سلطانی، م. ۱۳۷۵. انتشارات سازمان دامپزشکی کشور. ۵۳۱ صفحه
- ۵- پورغلام، رضا، علی مکرمی رستمی، علی اصغر سعیدی، عیسی شریف پور، احمد غرق، حمزه پورغلام، ۱۳۸۹. بررسی اثرات حاد باکتری استرپتوکوکوس فسیوم (*Streptococcus faecium*) روی بعضی از بافتها و مشخصه های خونی بچه ماهیان قزل آلا رنگین کمان. مجله علمی شیلات ایران. سال نوزدهم، شماره ۲، ۱۸ - ۹
- ۶- جی. پست.؟. بهداشت ماهی. ستاری، م. و روستایی، م.، ۱۳۷۷. انتشارات دانشگاه گیلان. ۲۸۴
- ۷- ستاری م. ماهی شناسی (۱). چاپ اول، انتشارات نقش مهر، ۱۳۸۱؛ ۱۸۶-۱۶۲
- ۸- سلطانی، م.، ۱۳۸۰. بیماریهای آزاد ماهیان. انتشارات دانشگاه تهران. ۴۴۴ صفحه
- ۹- سلطانی، مهدی و غلامرضا نیکبخت بروجنی، ۱۳۸۶، استرپتوکوکوزیس / لاکتوکوکوزیس در مزارع قزل آلا ایران، مجموعه خلاصه مقالات پنجمین گردهمایی دامپزشکان علوم بالینی ایران، ۲۵ - ۲۳ بهمن ۱۳۸۶، اهواز، ایران، ۴
- ۱۰- عمادی، حسین، ۱۳۸۴، تکثیر و پرورش ماهی قزل آلا و آزاد، نشر آبریان
- ۱۱- عمادی ح. تکثیر و پرورش ماهی قزل آلا و آزاد. چاپ هشتم، انتشارات علمی آبریان، ۱۳۸۶؛ ۸-۱.
- ۱۲- فرریکس، ن. و میلر، الف.؟. جداسازی و شناسایی عوامل بیماریزای باکتریایی در ماهی. سلطانی، م. شریف پور، ع. و قیاسی، م. ۱۳۸۳. انتشارات بین الملل شمس. ۹۴ صفحه
- ۱۳- فرزانه فرح. تکثیر و پرورش آزاد ماهیان. چاپ اول، مؤسسه تحقیقات شیلات ایران، ۱۳۸۴؛ ۶-۳ و ۵۱-۳۲
- ۱۴- فغانی، ط.، ۱۳۸۵. پایان نامه کارشناسی ارشد، اثر ارگوسان Aquavac Ergosan و واکسن Aquavac Garvetil بر فاکتورهای رشد، بازماندگی، تحریک سیستم ایمنی و رویارویی با باکتری استرپتوکوک در قزل آلا رنگین کمان، ۱۲۳ صفحه. صفحات ۱ و ۴.
- ۱۵- قلی پور کنعانی، حسنا، داور شاهسونی، احمد رضا موثقی، ۱۳۸۶، مجموعه خلاصه مقالات پنجمین گردهمایی دامپزشکان علوم بالینی ایران، ۲۵ - ۲۳ بهمن ۱۳۸۶، اهواز، ایران، ۱۵

- ۱۶- قیاسی، مریم، آذین زاهدی، حسینعلی خوشباور رستمی، ۱۳۷۹، بروز اپیدمی استرپتوکوکوزیس (Streptococcosis) در ماهیان مولد قزل آلالی رنگین کمان، اولین همایش بهداشت و بیماریهای آبزیان، ۲۷-۲۵ بهمن، اهواز، ایران، ۵۲
- ۱۷- قیاسی، مریم و آذین زاهدی، ۱۳۸۶، شناسایی عوامل بیماریزا در مزارع تکثیر و پرورش قزل آلالی رنگین کمان در استان مازندران، سمینار ملی زیست شناسی، ۲۴-۲۶ اردیبهشت ۱۳۸۶، مرنده، ایران، ۱۱۱
- ۱۸- لاوسون ت و جعفری باری م. اصول مهندسی آبزیان. چاپ اول، معاونت تکثیر و پرورش آبزیان، ۱۳۸۰؛ ۳۱-۶۵
- ۱۹- لیف، م. و پیرس، ب. ؟. اطلس رنگی میکروبیشناسی عملی. سعیدی اصل، م. صفری، ر. و میرزایی، ح. ۱۳۸۱. انتشارات نشر جهانکده. ۱۴۷ صفحه
- ۲۰- مظلومی، م.، ۱۳۸۲. استرپتوکوکوز، انتروکوکوز: بیماریهای مهم اقتصادی در پرورش ماهی، انتشارات نوید شیراز، چاپ اول. ۹۴ صفحه.
- ۲۱- موسوی، سید سمانه، ۱۳۸۶ بررسی بروز استرپتوکوکوزیس و استافیلوکوکوزیس در مزارع منتخب تکثیر و پرورش قزل آلالی رنگین کمان، پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان
- ۲۲- ناظم، م. و نادری نسب، م.، ۱۳۶۷. باکتری شناسی پزشکی. انتشارات آستان قدس رضوی. ۳۲۰ صفحه. ۲۸
- ۲۳- وثوقی، غ.، مستجیر، ب.، ۱۳۷۹. ماهیان آب شیرین، انتشارات دانشگاه تهران، ۳۱۷ صفحه - صفحه ۱۳۷ - ۱۳۸
- ۲۴- وزیری، ب.، ۱۳۶۳. اصول آزمایشهای بیوشیمیایی در میکروب شناسی تشخیصی، انتشارات امیر کبیر، ۱۷۶ صفحه
- ۲۵- هوشمند، الهام و حمید حقیقی، ۱۳۸۸، استرپتوکوکوس دیسگالاکتیه عامل استرپتوکوکوزیس در یک مزرعه پرورش قزل آلالی رنگین کمان در غرب گیلان، نخستین همایش ملی ماهیان سردآبی، ۲۴ - ۲۲ اردیبهشت ۱۳۸۸، تنکابن، ایران، ۱۱۴.

- 26- Agnew, W. and Barnes, A.C., 2007. *Streptococcus iniae*: An aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination, Journal of Veterinary Microbiology, Vol.122, pp.1-15.
- 27- Amal, M.N.A., Zamri-Saad, M., 2011, Streptococcosis in Tilapia (*Oreochromis niloticus*): A Review, *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.* 34 (2): 195 – 206
- 28- Austin, B. and Austin, D. 1993. Bacterial fish pathogens diseases in farmed and wild fish. Ellis Horwood limited. pp.27-37 and 70-73
- 29- Austin, B. and Austin, D.A. 1999. Third ed. Chapter 2: Characteristics of the diseases. In *Bacterial Pathogens: Diseases of Farmed and Wild Fish*. Springer-Praxis, Praxis Publishing, Ltd. Chichester, cUK. pp 13-15.
- 30- Baya, A.M., Lupiani, B., Hetircik, F.M., Roberson, B. S., Lukacovic, R., May, E. and Poukish, C. 1990. Association of *Streptococcus sp.* With fish mortalities in the Chesapeake Bay and its tributaries. *Journal of Fish Diseases* 13, 251-253

- 31- Beack. G. W; Kim. J. H; Gomez. D. K; Park. S. C; 2006, Isolation and characterization of *Streptococcus* sp. from diseased flounder (*Paralichthys olivaceus*) in Jeju Island, *Journal of Veterinary Science*, 7(1), 53 – 58
- 32- Bekker. A, Hugo. C, Albertyn. J, Boucher. C. E, Bragg. R. R, Pathogenic Gram-positive cocci in South African rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), *Journal of Fish Diseases*, 34: 483–487
- 33- Blv.J. E and Clem. L. W, 1992, Temperature and teleost immune functions, *Fish & Shellfish Immunology*, 2, 159-171
- 34- Bond C. Biology of fishes. Oregon state university, 1979; 85-112.
- 35- Bowser, P.R.; Wooster, G.A.; Getchell, R.G.; Timmons, M.B. 1998. *Streptococcus iniae* infection of tilapia *Oreochromis niloticus* in a recirculation production facility, *Journal of the World Aquaculture Society* . vol. 29, no. 3, pp. 335-339
- 36- Boyd CE. Water quality management for pond fish culture. 1 edition. Amsterdam. Elsevier Science Publishers, 1982; 6-49
- 37- Bragg. R.R. and Broere J.S.E., 1986, Streptococcosis in rainbow trout in South Africa. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* , 6: 89–91.
- 38- Brunt, J. and Austin, B. 2005. Use of a probiotic to control lactococcosis and streptococcosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) . *Journal of fish diseases*. vol. 28, pp. 693-701
- 39- Carson. J; Judkovs. N; Austin. B; 1993, Characteristics of an Enterococcus-like bacterium from Australia and South Africa, pathogenic for rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Journal of Fish Disease*, 16: 381-388
- 40- Coffey. T. J. , Pullinger. G. D, Urwin. R, Jolley. K. A, Wilson. S. M, Maiden. M. C, Leigh. J. A, 2006, First Insights into the Evolution of *Streptococcus uberis*: a Multilocus Sequence Typing Scheme That Enables Investigation of Its Population Biology, *Applied and Environmental Microbiology*, 1420–1428
- 41- Colorni, A.A., Diamant, A. Eldar, A. Kvitt, H. and Zlotkin, A. 2002. *Streptococcus iniae* infections in Red Sea cage-culture and wild fish. *Diseases of Aquatic Organism*, Vol. 49, pp. 165-170
- 42- Darwish A.M. and Ismaiel A.A. 2003. Laboratory efficacy of amoxicillin for the control of *Streptococcus iniae* infection in sunshine bass. *Journal of Aquatic Animal Health*. vol . 15 , pp. 209-214
- 43- Darwish, A.M. and Hobbs, M.S. 2005. Laboratory efficacy of amoxicillin for the control of *Streptococcus iniae* infection in blue tilapia. *Journal of Aquatic Animal Health* .vol . 17 , pp. 197-202
- 44- Egusa. Sh., 1991, Infectious diseases of fish. English transl., Sakana no Kansensho . Oxonian press Pvt. Ltd. New Delhi, 696 PP
- 45- Eldar. A., Frelier P.F., Asanta L., Varner P.W., Lawhon S., Bercovier H., 1995, *Streptococcus shiloi*, the name for an agent causing septicemic infection in fish, is a junior synonym of *Streptococcus iniae*, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45: 840–842.
- 46- Eldar, A. and Ghittino, C. 1999. *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: similar, but different diseases, *Journal of Diseases of Aquatic Organisms* . vol. 36, no. 3, pp. 227-231
- 47- Eldar, A.; Horovitz, A. and Bercovier, H. 1997. Development and efficacy of a vaccine against *Streptococcus iniae* infection in farmed rainbow trout, *Journal of VET. IMMUNOL. IMMUNOPATHOL.* vol. 56, no. 1-2, pp. 175-183
- 48- Eldar, A.; Perl, S.; Frelier, P.F. and Bercovier, H. 1999. Red drum *Sciaenops ocellatus* mortalities associated with *Streptococcus iniae* infection, *Journal of Diseases of Aquatic Organisms* . vol. 36, no. 2, pp. 121-127
- 49- Erfanmanesh. A, Soltani. M, Pirali. E, Mohammadian. S, Taherimirghaed. A, 2012, Genetic Characterization of *Streptococcus iniae* in Diseased Farmed Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran, *The Scientific World Journal*, 1 -6
- 50- Evans D, Claiborne J. The physiology of fishes. Third Edition. CRC, New York, 2006; 110-258.
- 51- Evans, J.; Klesius, P.H. and Shoemaker, C. 2006. Therapeutic and prophylactic immunization against *streptococcus iniae* infection in hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*) . *Journal of Aquaculture Research*. vol. 37, pp. 742-750
- 52- Evans, J.J., Klesius, P.H., Gilbert, P.M., Shoemaker, C., Al-Sarawi, M., Landsberg, J., Durumdez, R., Al-Marzouk, A., Al-Zenki, S., 2002. Characterization of β -haemolytic Group B *Streptococcus agalactiae* in cultured seabream, *Sparus auratus* and wild mullet, *Liza klunzingeri* (Day) in Kuwait. *Journal of Fish Diseases*, 25: 505–513.
- 53- Evans, J.J., Pasnik, D.J., Klesius, P.H., & Al-Ablani, S, 2006b, First report of *Streptococcus agalactiae* and *Lactococcus garvieae* from wild bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *Journal of Wildlife Diseases*, 45: 561-569

- 54- Evans, J.J., Pasnik, D.J., Klesius, P.H., & Shoemaker, C.A., 2006a, Identification and epidemiology of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus agalactiae* in tilapia, *Oreochromis* spp. International Symposium on Tilapia in Aquaculture 7 (pp. 25-42). Charles Town, WV, USA, American Tilapia Association.
- 55- Evans, J.J., Klesius, P. H., Pasnik, D. J., Bohnsack, J. F, 2009, Human *Streptococcus agalactiae* Isolate in Nile Tilapia(*Oreochromis niloticus*), *Emerging Infectious Diseases* • www.cdc.gov/eid, 15(5): 774 -,776
- 56- Facklam, R., Elliott, J., Shewmaker, L., Reingold, A, 2005. Identification and characterization of sporadic isolates of *Streptococcus iniae* isolated from humans. *J. Clin. Microbiol.* 43, 933-937
- 57- Facklam, R., Padula, J. F., Thacker, L. G., Wortham, E. C., and Sconyer, B. J., 1973 . presumptive identification of group A, B and D streptococci. *Appl. Microbiol.* 27: 107 – 113
- 58- Fadaeifard, F, Momtaz, H, Rahimi, E, Mirzakhani, A, 2011, Detection of streptococcus iniae and *Lactococcus garvieae* by multiplex polymerase chain reaction (PCR) in some rainbow trout farms of Iran, *African Journal of Biotechnology*, 11(2): 260-263
- 59- Filho, C. I; Muller, E. E; Preto-Giordano, L. G; Bracarense, F. R. L.; 2009, Histological finding of experimental *Streptococcus agalactiae* infection in nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), *Brazilian Journal Veterinary Patology*, 2(1): 12 – 15
- 60- Foo, J.T.W., Ho, B; Lam, T.J.; 1985, Mass mortality in *Siganus canaliculatus* due to streptococcal infection. *Aquaculture*, 49: 185–195
- 61- George, T.T. 1999. Canadian doctors confirm the infection and effects of *Streptococcus iniae* in fish and humans, Contributed-papers-Aquaculture-Canada-no. 98-2, pp. 87-89
- 62- Ghittino, C., Praero, M., 1992, Report of streptococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Italy: preliminary note. *Bolletino Della Societa Italiana di Patologia Ittica* , 8: 4–11.
- 63- Gholipour, H., Shahsavani, D., Rad, M., 2009, Streptococcal septicemia in raibow trout farms in Sabzevar, 1st International congress on aquatic animal health maneagment and disese, January 27 – 28 2009, Tehran, Iran, 174
- 64- Gill, p.; Vivas, J.; Gallardo, C.S. and Rodriguez ,L.A. 2000. First isolation of *Staphylococcus warneri*, from diseased rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in Northwest Spain. *journal of fish diseases* . Vol. 23, pp. 295-298
- 65- Habibipour, R, Bayat, S., 2009, Study of streptococcosis in rainbow trout farm in Hamedan Province, 1st International congress on aquatic animal health maneagment and disese, January 27 – 28 2009, Tehran, Iran, , 174
- 66- Haghighi Khiabani Asl, A, Soltani, M, Kazemi, B, Sohrabi Haghdost, E, Sharifpour, 2007, Use of immunohistochemichal and PCR methods of infectious heamatopoietic necrosis disease in some rainbow trout hatcheris in Iran, *Pakistan journal of Biology Sciences*, 10 (2): 230 – 234
- 67- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staly, J.T. and Williams, T.S. 1994. Bergey's Manual of Determinative bacteriology. Williams and Wilkins. pp. 787
- 68- Huang, Sh.; Chen, W.; Shei, M.; Liao, L. and Chen , Sh. 1999. Studies on Epizootiology and pathologency of *Staphylococcus epidermidis* in Tilapia (*aeochromis* sp) Cultured in Taiwan. *Journal of Zoological studies* . vol. 38 , pp. 178-188
- 69- Huet M. Breeding and cultivation of fish. 2nd edition. Fishing News Books, 1994; 314-320
- 70- Inglis, V., Roberts, R.J. and Bromage, N.R. 1993. Chapter 12, Streptococcal Infections. In *Bacterial Diseases of Fish*, Halsted Press, John Wiley & Sons, Inc., NY. pp. 196-97.
- 71- Kitao, T. 1982. The methods for detection of *Streptococcus* sp. Causative bacteria of streptococcal disease of culture yellow tail (*Seriola quinqueradiata*). *Fish Pathology*, Vol. 17, pp. 17-26
- 72- Kitao, T., Aoki, T. and Iwata, K. 1979. Epidemiological study on streptococcosis of cultured yellow tail (*Seriola quinqueradiata*). Discription of *Streptococcus* sp. In sea water and muds around yellowtail farms. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, Vol. 45, pp. 567-572
- 73- Kitao, T., Aoki, T. and Sakoh, R. 1981. Epizootics caused by β -haemolytic *Streptococcus* species in cultured fresh water fish. *Fish Pathology*, Vol. 15, pp. 301-307
- 74- Klesius, P.H., Evans, J.J., Shoemaker, C.A., Yeh, H., Goodwin, A.E., Adams, A., Thompson K., 2006, Rapid detection and identification of *S. iniae* using a monoclonal antibody based indirect flourescent antibody technique. *Aquaculture*, 258: 180-186.
- 75- Klontz GW. Enviromental Requirements and Enviromental diseases of Salmonids. In: Stoskopf MK, *Fish medicine*. Philadelphia: WB Saunders Company, 1993; 333
- 76- Koh, T.H., Kurup, A. and Chen, J., 2004. *Streptococcus iniae* discitis in Singapore. *Emerg. Infect. Dis.* Vol. 10, pp. 1694-1696
- 77- Kusuda, R. and Takemaru, I. 1987. Efficacy of josamycin against experimental streptococcal infection in cultured yellowtail. *Nippon Suisan Gakkaishi*, Vol. 53, pp. 1519-1523

- 78- Kusuda, R., Kawai, K., Salati, F., Banner, C. R. and Fryer, J.L. 1991. *Enterococcus seriolicida* sp. Nov., a fish pathogen. International Journal of Systematic Bacteriology, Vol.41, pp.406-409
- 79- Kusuda, R., Kawai, T., Toyoshima, T. and Komatsu, I. 1976. A new pathogenic bacterium belonging to the genus *Streptococcus*, isolated from an epizootic of cultured yellowtail. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, Vol. 42, pp.1345-1352
- 80 - Lau, S.K.P., Woo, P.C.Y., Luk, W.K., Fung, A.M.Y., Hui, W.T., Fong, A.H.C., Chow, C.W., Wong, S.S.Y., Yuen, K.Y., 2006. Clinical isolates of *Streptococcus iniae* from Asia are more mucoid and β - hemolytic than those from North American. *Diagnostic Microbiol. Infect. Dis.* Vol. 54, pp. 177-181
- 81- Lau, S.K.P., Woo, P.C.Y., Tse, H., Leung, K.W., Wong, S.S.Y., Yuen, K.Y., 2003. Invasive *Streptococcus iniae* infection outside North American. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1004-1109
- 82- MacFaddin, J.F. 2000. *Biochemical Testes for Identification of medical Bacteria*. Williams and Wilkins. pp. 912
- 83 - Mata, A. I, Blanco. M. M, Domínguez. L, Fernández-Garayzábal. J. F, Gibello. A, 2004a, Development of a PCR assay for *Streptococcus iniae* based on the lactate oxidase (lctO) gene with potential diagnostic value, *Veterinary Microbiology* 101:109–116
- 84 - Mata, A. I, Gibello. A, Casamayor. A., Blanco. M. M., Domínguez. L, Fernández-Garayzábal. J. F., 2004b, Multiplex PCR Assay for Detection of Bacterial Pathogens Associated with Warm-Water Streptococcosis in Fish, *Applied and Environmental Microbiology*: 3183–3187
- 85 - Meyer, V. k. and Schonfeld, H. 1929. Über die Unterscheidung des *Enterococcus* vom *Streptococcus viridans* und die Beziehungen beider zum *Streptococcus lactis*. *Zentralbl. Bakt. Abt. 1 orige.* 99:402 – 418
- 86 - Mian. G. F., Godoy. D. T, Leal. C. A. G, Yuhara. T. Y, Costa. G. M., Figueiredo. H. C. P., 2008, Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia, *Veterinary Microbiology*, 136(1 – 2): 180 – 183
- 87 - Michel. C., Nougayre`de P., Eldar A., Sochon E., De Kinkelin. P., 1997, *Vagococcus salmoninarum*, a bacterium of pathological significance in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* farming. *Diseases of Aquatic Organisms*, 30:199–208.
- 88 - MMWR. 1996. 2 August, 45(30); 650 – 53. Invasive Infection with *Streptococcus iniae*, Ontario, 1995-1996. Morbidity and Mortality Weekly Report available on-line from the Centers for Disease Control's website at www.cdc.gov/mmwr.
- 89 - Mohammadi Arani. M., Moghadas. m B., 2009, Infection of rainbow trout with *Streptococcus* spp. in Isfahan Province, 1st International congress on aquatic animal health management and disease, January 27 – 28 2009, Tehran, Iran, 126
- 90 - Ndong, D., Chen, Y.Y., Lin, Y.H., Vaseeharan, B. and Chen, J.C. 2006. The immune response of tilapia *Oreochromis mossambicus* and its susceptibility to *Streptococcus iniae* under stress in low and high temperatures. *Journal of Fish and Shellfish Immunology*. Vol.22, pp. 686 – 694
- 91 - Nguyen, H.T., Kanai, K. and Yoshikoshi, K., 2002. Ecological investigation of *Streptococcus iniae* in cultured Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) using selective isolation procedures. *Journal of Aquaculture*, Vol. 205, pp. 7-17
- 92 - Noga, E.J. 1996. *Fish disease: diagnosis and treatment*. Iowa State University Press/Ames, Iowa, pp.367
- 93 - Nomoto, R., Munasinghe, L.I., Jin, D.H., Shimahara, Y., Yasuda, H., Nakamura, A., Misawa, N., Itami, T., Yoshida, T., 2004. Lancefield group C *Streptococcus dysgalactiae* infection responsible for fish mortalities in Japan. *Journal of Fish Diseases*, 27: 679–686.
- 94 - Oliver, K., Procop, G.W. Wilson, D. Coull, J. and Stender, H. 2002. Rapid identification of *Staphylococcus aureus* Directly from Blood Culture by Fluorescence In Situ Hybridization with Peptide Nucleic Acid Probes. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 40, pp. 247-251
- 95 - Pall, J. and Pradhan, K. 1990. Bacterial involvement in ulcerative condition of air- breathing fish from India. *Journal of Fish Biology*, Vol. 36, pp. 833-839
- 96 - Pasnik, D.J., Evans, J.J. and Klesius, P.H. 2006. Passive immunization of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) provides significant protection against *Streptococcus agalactiae*. *Journal of Fish and Shell fish Immunology*, Vol. 21, pp.365-371
- 97 - Pasnik. D. J., Evans. J. J, Klesius. P. H., 2009, Fecal Strings Associated with *Streptococcus agalactiae* Infection in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, *The Open Veterinary Science Journal*, 3: 6-8
- 98 - Perera. R.P., Johnson. S.K., Collins. M.D., Lewis D.H., 1994, *Streptococcus iniae* associated with mortality of Tilapia nilotica \times T. aurea hybrids. *Journal of Aquatic Animal Health*, 6: 335–340.
- 99 - Pillay TVR, Kuttu MN. *Health and diseases*. In: *Aquaculture principles and practices*. 2nd edition. Blackwell Publishing, 2005;112-118.

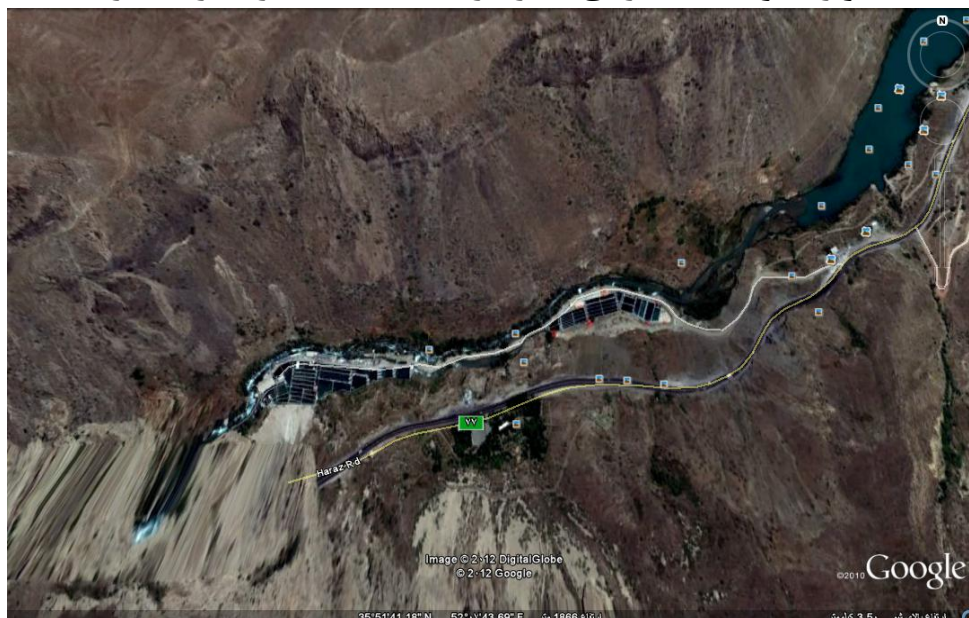
- 100 - Pillay TVR, Kutty MN. Sustain ability and environmental management of aquaculture. In: Aquaculture priciples and peactices. 2nd edition.Blackwell Publishing, 2005; 311-312
- 101 - Plumb, J.A., Schachte, J.H., Gaines, J.L., Peltier, W. and Carroll.B. 1974. *Streptococcus* sp. From marine fishes along the Alabama and northwest Florida coast of the Gulf of Mexico. Transactions of the American Fisheries Society, Vol. 103, pp. 358-361
- 102 - Roach, J.C., Levett, P.N., & Lavoie, M.C.,2006,Identification of *S. iniae* by commercial bacterial identification systems. *Journal of Microbiological Methods*, 67: 20-26.
- 103 - Roberts RJ.Fish pathology.London: Harcourt Publisher Limited, 2001, 1-13 , 199-205
- 104 - Rochaix, A. 1924. Mileaux a l' esculine pour le diagnostic differential des bacteries due groupe Strepto – Entro Pneumocoque . *Ct. R. Soc. Biol.* Vol.90, pp. 771-772
- 105 - Rodkhum, C, Kayansamruaj, P, Pirarat, N, 2011, Effect of Water Temperature on Susceptibility to *Streptococcus agalactiae* Serotype Ia Infection in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*), *Thai J Vet Med*,41(3): 309-314.
- 106 - Romalde, J.L., Lores,F., Magarinos, B., Barja, L. and Toranzo, A.E. 2000. Study of cell surface associated virulence factors of *Streptococcus parauberis* strains pathogen for turbot. Bulltan of European Association of Fish Oathology, Vol.20, pp.244-251
- 107 - Romalde, J.L., Toranzo, A.E. 1999. Streptococcosis of marine fish. Gilles Oliver , No. 56
- 108- Romalde, J. Magarinos, L, Villar, C, Barja, J. L, Toranzo, A. E, 1999, Genetic analysis of turbot pathogenic *Streptococcus parauberis* strains by ribotyping and random amplified polymorphic DNA, *FEMS Microbiology Letters*, 459: 297-304
- 109 - Russo, R., Mitchell, H. and Yanong, R.P.E, 2006. Characterization of *Streptococcus iniae* isolated from ornamental cyprinid fishes and development of challenge models, *journal of Aquaculture*. Vol.256, pp. 105 – 110
- 110 - Russo,R. and Yanong,R.2006. Dietary Beta-Glucans and Nucleotides Enhance Resistance of Red-Tail Black Shark (*Epalzeorhynchos bicolor*) to *Streptococcus iniae* Infection . *journal of The world aquaculture society*.vol. 37,No.3,pp.298-306
- 111 - Sako, H., 1998. Studies on *Streptococcus iniae* infection in Yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Bull. Nansi Natl. Fish. Res. Inst.* 31, 63-120
- 116- Salvador, R., Muller, E.E., Freitas, J.C., Leonhardt, J.H., Giordano, L.G.P., Dias, J.A ,2005, Isolation and characterization of *Streptococcus* spp. group B in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in hapas nets and earth nurseries in the northern region of Parana State, *Brazil. Ciencia Rural. Santa Maria*, 35: 1374-1378.
- 112 - Shahbazian, N,Maghsudifard, A, E., Abdi, K. Sheikhzadeh, N, 2010, Study the status of Streptococcosis in Rainbow trout fish farms in kermanshah province in 2009, 2nd International congress on aquatic animal health maneagment and disese, October 26 – 27 2010, Tehran, Iran
- 113 - Shelby, R.A., Klesius P.H. Shoemaker, C.A. and Evans, J.J. 2002. Passive immunization of tilapia, *Oreochromis niloticus*, with anti-*Streptococcus iniae* whole sera. *Journal of Fish Diseases*, Vol.25, pp.1-6
- 114 - Shen, Z.H., Qian, D., Xu, W.J., Gu, J.H. and Shao,J.Z. 2005. Isolation, identification and pathogenicity of *Streptococcus iniae* isolated from red drum *Sciaenops ocellatus* . *Acta Hydrobiol.Sinica* , Vol.29, pp. 678-683
- 115 - Shoemaker, C.A., Evans, J.J. and Klesius, P.H. 2000. Density and dose: factors affecting mortality of *Streptococcus iniae* infected tilapia (*Oreochromis niloticus*), *journal of Aquaculture* . vol. 188, no. 3-4, pp. 229-235
- 116 - Shoemaker, C.A., Klesius, P.H. 1997 . Streptococcal disease problems and control : a review . In : Tilapia Aquacultured (ed.by K.fitzsimmons) , pp. 671 – 680. Northest Regional Aquacultural Engineering Service , Ithaca , NY.
- 117 - Shoemaker, C.A., Klesius, P.H. and Evans, J.J. 2001. prevalence of *Streptococcus iniae* in tilapia, hybrid striped bass, and channel catfish on commercial fish farms in the United States. *Am. J. Vet. Res*, Vol. 62, pp. 174-177
- 118 - Soltani.M., Tarahomi. M, 2009, Study of streptococcosis/Lactococcosis in some farmed rainbow trout in Fars province, Iran, 1st International congress on aquatic animal health maneagment and disese, January 27 – 28 2009, Tehran, Iran, 113
- 119 - Stickney RR. Understanding and maintaining water quality. In: Aquaculture: An Introductory text. 1st edition. India: CABI Publishing, 2005; 95-127.
- 120 - Subasinghe. R. P, 2005, Epidemiological approach to aquatic animal health management: opportunities and challenges for developing countries to increase aquatic production through aquaculture, *Preventive veterinary medicine*, 67, 117 – 124

- 121 - Toranzo. A. E; Devesa. S; Heinen. P; Riaza. A; Nuñez. S; Barja. J. L.; (1994), Streptococcosis in cultured turbot caused by an Enterococcus-like bacterium, *Bulltan of European Association of Fish Pathology*, 14:19–23
- 122 - Treves-Brown, K. M. 2000. Applied fish pharmacology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp.294
- 123- Varvarigos, P. 2001. Gram positive cocco- bacteria(*Micrococcaceae*, *Streptococcaceae*) causing systemic disease in intensively farmed fish. Veterinary services to aquaculture and distribution of fish health production.
- 124- Vela, A.I., Vazquez, J., Gibello, A., Blanco, M.M., Moreno, M.A., Liebana, P., Albendea, C., Alcala, b., Mendez, A., Dominguez, L. AND Garayzabal, J.F.F. 2000. Phenotypic and Genetic Characterization of *Lactococcus garvieae* Isolated in Spain from Lactococcosis Outbreaks and Comparison with Isolates of Other Countries and Sources. *Journal of Clinical Microbiology* , Vol.38 ,pp.3791-3795
- 125- Vendrell. D., Balcazar. J. L., Ruiz-Zarzuela. I., Blas. I., Girones. O, Muzquiz. J. L., 2006, *Lactococcus garvieae* in fish: A review, *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 29: 177–198
- 126- Xu, D.H., Shoemaker, C.A., Klesius, P.H., 2007, Evaluation of the link between grodactylosis and Streptococcus of Nile tilapia (*O. niloticus*). *L . Fish Diseases*, 30: 230-238
- 127- Yang. W, Li. A, 2009, Isolation and characterization of Streptococcus dysgalactiae from diseased *Acipenser schrenckii*, *Aquaculture*, 294:14–17
- 128- Yanong, R.P.E., Floyd, R.F, 2002. Streptococcal infection of fish. Florida Cooperative Extension Service. IFAS, University of Florida, p. 3. Circular FA057
- 129- Yanong, R. P. E. and Francis-Floyd. R., 2002, Yanong Streptococcal infections of fish. Report from University of Florida. Series from the Department of Fisheries and Aquatic Sciences, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. <http://edis.ifas.ufl.edu>
- 130- Yasunaga, N. 1982. Occurrence of Streptococcus sp., a pathogen of cultured yellowtail, in muscle of sardine for diets. *Journal of Fish Pathology*, Vol.17, pp.195-198
- 131- Yuniarti, A. 2005. Serological Characterization of Streptococcus iniae Isolates from Different Parts of Australia. Masters. University of Queensland, St. Lucia, Queensland.
- 132- Zarzuela,R.I., Bias, I., Girones, O., Ghittino, C. and MuAzquiz, J.2005. Isolation of *Vagococcus salmoninarum* in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Veterinary Research Communications*, Vol. 29, pp. 553-562
- 133- Zlotkin, A., Hershko, H., & Eldar, A., 1998, Possible transmission of Streptococcus iniae from wild fish to cultured marine fish, *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 4065-4067.
- 134- [http://www.the.fish.site.com/articles/190/ Streptococcus in tillapia](http://www.the.fish.site.com/articles/190/Streptococcus%20in%20tillapia)

پیوست

پیوست الف : تصاویر ماهواره ای مزارع نمونه برداری

شکل الف-۱ تصویر ماهواره ای از مزارع وا سر (مزرعه شماره ۱) و قزل سراب (مزرعه شماره ۲)



شکل الف-۲ تصویر ماهواره ای از مزارع چند منظوره و قزل نیاک



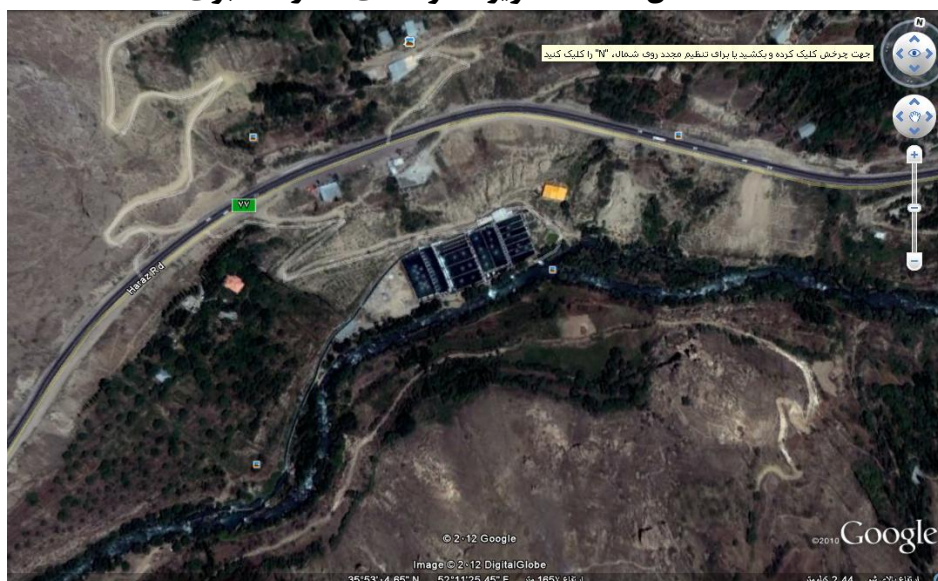
شکل الف-۳ تصویر ماهواره ای از مزرعه قزل آلای هراز



شکل الف-۴ تصویر ماهواره ای از مزارع کاج قزل، رنگین ماهی



شکل الف-۵ تصویر ماهواره ای از مزرعه نبوی



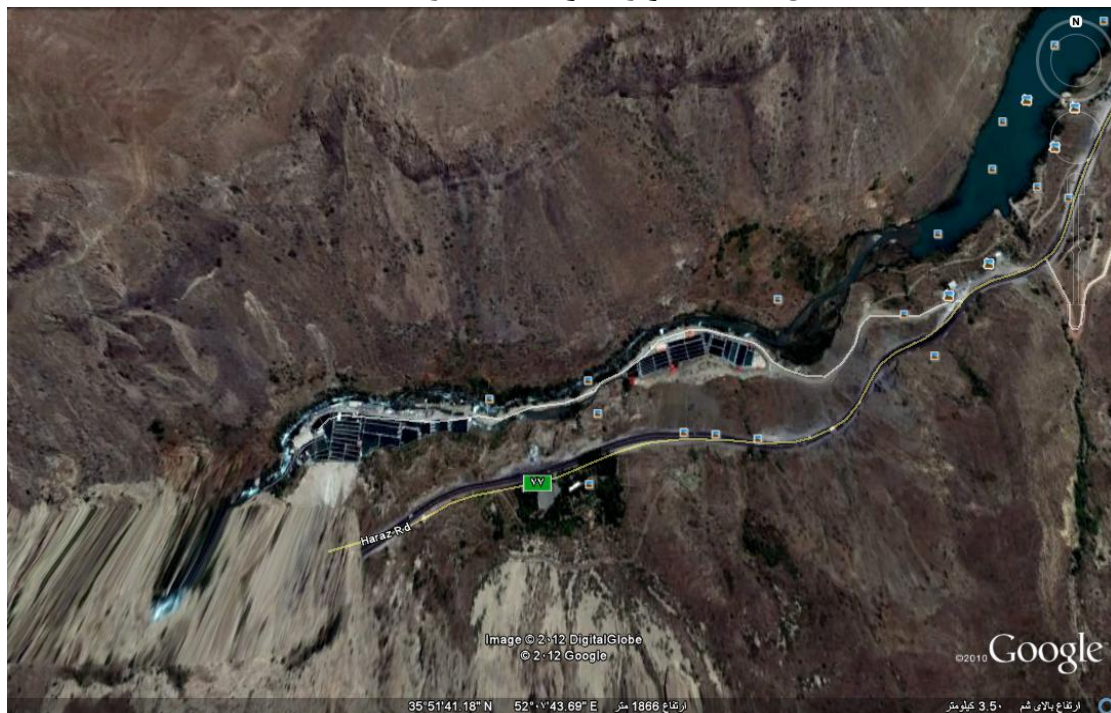
شکل الف-۶ تصویر ماهواره ای از مزرعه نگین هراز



شکل الف-۷ تصویر ماهواره ای از مزرعه نل قزل



شکل الف-۸ تصویر ماهواره ای از مزرعه شماره ۸



Abstract

One of the most important bacterial fish diseases which has caused some outbreaks in rainbow trout farms in Iran is streptococcosis. The farmers were suffering from huge economic losses due to the disease outbreaks in different rainbow trout farms in Iran. The aim of our study was to determine rate of streptococcosis incidence in different stage of growth in farmed rainbow trout in Haraze River, Mazandaran province. Fish and water samples were randomly collected and measured of randomly in 10 selected farms, monthly throughout a year. After clinical observations, Isolation and recognition of strep strains were made using biochemical tests. Some Environmental factors include Nitrate, Nitrite, Temperature, pH, Ammonia and DO measured during sampling periods. According to our results 4.6% of juvenile samples showed clinical singe of streptococcosis while only 0.7% of them had strep. Contamination. These rates in adult samples were 8.9 and 1 percent respectively. Major isolated bacterial strain was *Streptococcus uberis*. Incidence of streptococcosis in rainbow trout 20% affected by fluctuation of Nitrite, temperature and DO. Management of these factors can decrease rate of disease outbreaks.

Key words: Streptococcosis , Incidence , Rainbow trout , Mazandaran province , Environmental factors

**Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Sciences Research Institute – Caspian Sea Ecology Research Center**

Project Title : A survey on some risk factors and evaluation of their impacts on streptococcosis in rainbow trout farms in east of Mazandaran province (Haraz River)

Approved Number:14-76-12-9001-90004

Author: Ali Asghar Saeedi

Project leader Researcher : Abolfazl Sepahdari

Collaborator(s) : I.Sharifpour,Sh.Kakolaki,M.Fallah.R.Porgholam,M.Sharif rohani,M.R.Mehrabi,Sh.Behrozi,M.Ghiasi,A.Zahedi tabarestani,F.Habibi kotanahi,L.Zabihi,A.Omomi,R.Porzahedi

Advisor(s): K.Abdi

Supervisor:S.J.Zorrieh zahra

Location of execution : Mazandaran province

Date of Beginning : 2011

Period of execution : 2 Years

Publisher : Iranian Fisheries Research Organization

Date of publishing : 2016

All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted without indicating the Original Reference

MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Sciences Research Institute - Caspian Sea Ecology Research Center

Project Title :

**A survey on some risk factors and evaluation of their
impacts on streptococcosis in rainbow trout farms in east
of Mazandaran province (Haraz River)**

Project Researcher :

Ali Asghar Saeedi

Register NO.

47579